

**Identificação morfológica e molecular de  
*Globodera pallida* e *Globodera rostochiensis*  
presentes em campos de batata portugueses**

**Maria João Santiago Militão Camacho**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Agronómica**  
**Especialização em Proteção de Plantas**

**Orientadores:** Doutora Maria de Lurdes Inácio  
Professor Doutor Arlindo Lima

**Júri:**

Presidente: Doutora Maria José Antão Pais de Almeida Cerejeira, Professora  
Associada com agregação do Instituto Superior de Agronomia da  
Universidade de Lisboa

Vogais: Doutor Manuel Galvão de Melo Mota, Professor Auxiliar com Agregação da  
Universidade de Évora

Doutora Maria de Lurdes Nunes Silva Inácio, Investigadora Auxiliar do  
Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

**“É o tempo que perdeste com a tua  
rosa que torna a tua rosa tão  
importante.”**

**In “O Príncipezinho”**

## Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer ao Professor Arlindo Lima por me ter transmitido muitos dos conhecimentos na área da proteção de plantas durante o curso de Mestrado, pelas orientações durante este trabalho, mas principalmente por me ter apresentado o Laboratório de Nematologia do INIAV em Oeiras e a sua responsável, Doutora Maria de Lurdes Inácio. Sem a aula de Nematologia no INIAV, esta dissertação nunca teria existido.

Como não poderia deixar de ser, quero agradecer à Doutora Maria de Lurdes Inácio a partilha de conhecimentos na área da Nematologia, a partilha de contactos (nacionais e internacionais), a disponibilidade, a alegria contagiante que tem em trabalhar em Nematologia, a orientação neste trabalho e por me ter proporcionado visitar outros laboratórios de Nematologia. A aula de Nematologia no INIAV e depois o Estágio de Verão no Laboratório de Nematologia foram tão aliciantes, que foram decisivos na escolha da temática para a dissertação de mestrado. Aprendi muito durante todo este tempo que estivemos juntas, mais do que eu imaginaria, e se surgirem oportunidades no futuro, gostava muito de poder continuar a aprender e a trabalhar ao seu lado.

Quero agradecer à Doutora Filomena Nóbrega a partilha de conhecimentos na área da biologia molecular, essenciais para a elaboração deste trabalho. Estou grata pela presença e orientação nos procedimentos laboratoriais, pelas explicações dos resultados obtidos, as confirmações dos resultados quando eram necessárias e a confiança que passava mesmo quando os trabalhos não corriam como o esperado. É a autora da frase que marcou este trabalho: “Se fosse fácil, já estava feito!”.

À Professora Mariana Mota quero agradecer o empurrão inicial na sementeira das batateiras e a orientação final no tratamento estatístico dos dados. Mesmo com mil e uma coisas para fazer, disponibilizou-se sempre para me ajudar em alturas essenciais deste trabalho.

A toda a equipa técnica do Laboratório de Nematologia do INIAV quero agradecer pela forma simpática com que me receberam. Quero agradecer principalmente à Técnica Superior Margarida Fontes pela disponibilidade, pela partilha de conhecimentos, por perguntar sempre se eu queria ver na lupa uma “sopa de nemátodes”, um *Bursaphelenchus xylophilus*, a diferença entre armadura bucal de um nemátode predador e de um micetófago, entre outros pormenores que iam surgindo na sua lupa e que achava ser interessante partilhar comigo.

Ao Doutor Christer Magnusson, do “The Norwegian Institute of Bioeconomy Research (NIBIO)” por ter aceitado ser consultor neste trabalho e me ter validado as medições necessárias para a caracterização morfométrica dos nemátodes.

Ao Engenheiro João Heitor e à Técnica Deolinda Brandão Duarte quero agradecer por me terem recebido no Laboratório da Proteção das Culturas, da Direção Regional de Agricultura e Pescas do Norte e me terem ensinado a extrair os quistos com o levigador de Fenwick e a isolar os quistos através do método da acetona. Foi muito importante aprender e praticar estes procedimentos.

À Professora Doutora Isabel Abrantes e à Doutora Carla Maleita do Centro de Ecologia Funcional, departamento de Ciências da Vida, da Universidade de Coimbra quero agradecer por me terem recebido no Laboratório e pelos conhecimentos transmitidos nesta área.

À minha querida amiga Leidy Rusinque, quero agradecer o companheirismo, a cumplicidade, a partilha, a amizade e a ajuda em todo este tempo que estivemos juntas. Foi muito bom ter partilhado toda esta aventura com uma amiga sempre disponível para as ocasiões. Ambas passamos por momentos de felicidade, frustração, alegria e angústia, mas juntas conseguimos sempre continuar em frente, cada uma com o seu trabalho.

Por último, à família, que por mais que se aprenda e evolua cientificamente, há sempre uma necessidade básica que só é preenchida pelo amor que uma família pode transmitir. E por isso quero agradecer à minha família maravilhosa: Filipe, Alice e Sara.

## Resumo

Os nemátodes de quisto da batateira, *Globodera rostochiensis* e *Globodera pallida*, são uma das maiores ameaças para a cultura da batata em todo o mundo. Estas espécies são consideradas organismos nocivos de quarentena e encontram-se sujeitas a medidas regulamentares rigorosas em muitos países. Como são muito semelhantes, torna-se essencial a seleção de métodos credíveis para a sua identificação.

A extração de quistos do solo é uma etapa determinante para detetar a presença de *Globodera*, e recomenda-se a utilização do levigador de Fenwick em análises de rotina, uma vez que é o método que recupera o maior número de quistos de uma amostra de solo.

A identificação das espécies de *Globodera* com base na morfologia revela-se complicada devido à variabilidade das características-chave e à sobreposição das medidas padrão, sendo necessária uma confirmação através de técnicas moleculares. O teste da PCR *multiplex*, com os *primers* ITS5/PITSp4+PITSr3, permite identificar as duas espécies, e é recomendado em análises de rotina. Contudo, apesar do desenvolvimento de métodos de identificação moleculares, o uso da caracterização morfológica permanece essencial, sendo duas abordagens complementares.

A análise aos campos de batata portugueses revelou um maior número de amostras com *G. pallida*, o que contraria as expectativas dado que até agora se tem considerado ser a espécie *G. rostochiensis* a mais disseminada em Portugal, à semelhança do que acontece no resto da Europa. Este facto leva a questionar se as medidas fitossanitárias estão a ser eficazes ou se estarão a contribuir para o aumento das populações de *G. pallida*, como tem vindo a suceder no Reino Unido.

Continua então a ser essencial a distinção entre as duas espécies para detetar a sua presença no território nacional visando a reavaliação das medidas de controlo até agora implementadas e a adoção de práticas mais eficazes.

**Palavras-chave:** Nemátodes de quisto da batateira, *Solanum tuberosum*, morfologia, PCR multiplex.

## Abstract

The potato cyst nematodes (PCN), *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*, are one of the greatest threat for the potato crop worldwide. These species are considered quarantine pests and are subject to strict regulatory measures in many countries. As they are very similar, robust methodologies are essential for their identification in order to make their control more effective.

The extraction of cysts from soil is a very important step in detecting the presence of PCN, and the Fenwick can is recommended in routine analysis, as it is the extraction method that recovers the most cysts from a soil sample.

The identification of *Globodera* species based on morphology is difficult due to the variability of the main morphological features and the overlapping of the standard measures in the two species, thus being the confirmation recommended through molecular techniques. The multiplex PCR test with *primers* ITS5/PITSp4+PITSr3, allows distinguishing both species, and can be used in routine analysis. However, despite the development of molecular identification methods, the use of the morphological approach remains useful, hence being two complementary approaches.

The analysis of soils coming from Portuguese potato fields detected a greater number of samples infested with *G. pallida*, which contradicts the expectations because *G. rostochiensis* was the most widespread species in Portugal and in other European countries. This leads to question whether the control measures are being effective or if *G. pallida* is being privileged, as occurring nowadays in the UK.

The distinction between the two species is therefore essential in order to detect their presence in the national territory with a view to re-evaluating the control measures so far implemented and adopting more effective practices.

**Key words:** Potato cyst nematodes, *Solanum tuberosum*, morphology, multiplex PCR.

## Índice

1. Introdução.....	1
1.1. <i>Globodera rostochiensis</i> , <i>Globodera pallida</i> e a cultura da batateira .....	1
1.2. Ciclo de vida dos nemátodes de quisto da batateira.....	4
1.3. Propagação e dispersão.....	6
1.4. Sintomas.....	7
1.5. Detecção e identificação.....	8
1.5.1. Métodos de extração.....	8
• Extração de nemátodes de quisto através do método de Fenwick.....	9
• Extração de nemátodes através do método de decantação e crivagem de Cobb.....	11
• Extração de nemátodes através do método de flutuação centrífuga.....	12
• Isolamento de quistos através de solventes orgânicos.....	13
1.5.2. Identificação das espécies <i>Globodera rostochiensis</i> e <i>Globodera pallida</i> .....	13
• Identificação morfológica.....	13
- Ovos.....	15
- Juvenil do segundo estágio.....	16
- Fêmeas/Quistos.....	17
- Machos.....	19
• Identificação molecular.....	20
- PCR <i>multiplex</i> .....	21
1.6. Medidas de controlo.....	22
1.7. Objetivo do trabalho.....	26
2. Material e Métodos.....	27
2.1. Obtenção de material biológico.....	27
2.1.1. Material de referência.....	27
2.1.2. Material biológico português.....	27
2.2. Extração de quistos de <i>Globodera</i> spp.....	27
2.3. Comparação da eficiência dos métodos de extração de quistos de amostras de solo.....	28
2.4. Análise morfológica.....	28
2.5. Análise molecular.....	29
2.5.1. Validação do método molecular para a deteção de <i>Globodera pallida</i> e <i>Globodera rostochiensis</i> .....	29

• Extração de DNA.....	30
• Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	30
• Análise molecular das amostras de <i>Globodera</i> portuguesas.....	32
3. Apresentação e discussão dos resultados.....	33
3.1. Inoculação das batateiras.....	33
3.2. Comparação da eficiência dos métodos de extração de quistos do solo.....	34
3.3. Análise morfológica e morfométrica de <i>Globodera rostochiensis</i> e <i>Globodera pallida</i> .....	37
3.3.1. Características morfológicas dos quistos das amostras estudadas....	37
3.3.2. Características morfológicas dos juvenis do segundo estágio das amostras estudadas.....	38
3.3.3. Análise das características morfológicas e morfométricas das amostras portuguesas e comparação com amostras de referência...	41
3.4. Análise Molecular.....	43
3.5. Comparação da identificação molecular com a identificação morfológica....	46
4. Conclusão.....	51
5. Referências bibliográficas.....	53
6. Anexos	
Anexo I – Extração de nemátodes de quisto através do método de Fenwick	
Anexo II – Extração de nemátodes através do método de decantação e crivagem de Cobb	
Anexo III - Extração de nemátodes através do método de flutuação centrífuga	
Anexo IV - Isolamento de quistos através de solventes orgânicos	



## **Lista de quadros**

**Quadro 1** – Caracterização taxonómica do género *Globodera*

**Quadro 2** – Valores indicativos da produção nacional de batata em 2015

**Quadro 3** – Características morfométricas dos ovos de *Globodera rostochiensis* e *Globodera pallida*

**Quadro 4** – Características morfométricas dos juvenis do segundo estágio de *Globodera rostochiensis* e *Globodera pallida*

**Quadro 5** – Características morfométricas das fêmeas/quistos de *Globodera rostochiensis* e *Globodera pallida*

**Quadro 6** – Características morfométricas dos machos de *Globodera rostochiensis* e *Globodera pallida*

**Quadro 7** – Nematodocidas com venda autorizada pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária

**Quadro 8** – *Primers* utilizados nas diferentes versões de reações de PCR para *Globodera rostochiensis* e *Globodera pallida*

**Quadro 9** – Componentes e respetivos volumes na mistura de reação da PCR

**Quadro 10** – Contagem de quistos extraídos das amostras de solo em estudo

**Quadro 11** – Características morfológicas e morfométricas dos quistos e dos juvenis do segundo estágio de *Globodera rostochiensis* e *Globodera pallida* portuguesas e de referência e respetiva identificação morfológica das espécies de *Globodera*

**Quadro 12** – Comparação da identificação das espécies de *Globodera* nas amostras de solo por análise morfológica e morfométrica e por análise molecular

**Quadro 13** – Características morfológicas e morfométricas dos quistos e juvenis do segundo estágio de *Globodera pallida* e *Globodera rostochiensis* portuguesas, após confirmação com testes moleculares

## **Lista de figuras**

**Figura 1** – Ciclo de Vida de *Globodera rostochiensis*.

**Figura 2** - Quisto de *Globodera rostochiensis* com ovos no interior.

**Figura 3** – Juvenil do segundo estágio imediatamente antes de eclodir do ovo.

**Figura 4** – Juvenil do segundo estágio a eclodir do ovo.

**Figura 5** – Sintomas de ataque de *Globodera* (folhas da base do caule murchas).

**Figura 6** – Sintomas de ataque de *Globodera* (folhas superiores enroladas e com manchas nas margens dos folíolos).

**Figura 7** – Método de Fenwick para extração de quistos de amostras de solo secas, seguido de isolamento com solvente orgânico.

**Figura 8** – Medição do diâmetro da vulva e da distância vulva-ânus.

**Figura 9** – Medição do comprimento do corpo.

**Figura 10** – Medição do comprimento do estilete.

**Figura 11** – Medição do comprimento da cauda.

**Figura 12** – Medição do comprimento da parte hialina da cauda.

**Figura 13** – Ovo com conteúdo granuloso.

**Figura 14** – Ovos com os juvenis deteriorados.

**Figura 15** – Juvenil de segundo estágio.

**Figura 16** – Quisto de *Globodera rostochiensis*.

**Figura 17** – Região terminal de *Globodera pallida*.

**Figura 18** – Padrões vulvares.

**Figura 19** - Macho de *Globodera spp.*.

**Figura 20** – Localização dos *primers* ITS5, PITSr3 e PITSp4 e demonstração da sua especificidade após alinhamento com sequências de *Globodera spp.*.

**Figura 21** – Quisto deteriorado.

**Figura 22** – Quisto com os ovos vazios.

**Figura 23** – Quisto viável com ovos e juvenis do segundo estágio.

**Figura 24** – Teste de comparação de médias para amostras emparelhadas para confrontação da eficiência dos dois métodos de extração (Fenwick x decantação e crivagem).

**Figura 25** – Teste de comparação de médias para amostras emparelhadas para averiguar a hipótese do método de Fenwick ser mais eficiente que o método de decantação e crivagem.

**Figura 26** - Quistos de *Globodera rostochiensis* da amostra Ro 2/3.

**Figura 27**- Quistos de *Globodera pallida* da amostra Pa3 (E400).

**Figura 28** – Corte da região terminal de um quisto de *Globodera pallida*, em diferentes focagens, onde se observa a vulva fenestrada, o padrão vulvar e o ânus em forma de V.

**Figura 29** – Corte da região terminal de um quisto de *Globodera rostochiensis*, em diferentes focagens, onde se observa a vulva fenestrada, o padrão vulvar e o ânus em forma de V.

**Figura 30** – Corte da região terminal de quisto de *Globodera pallida*, que não é evidente para diferenciar as espécies de *Globodera*.

**Figura 31** – Corte da região terminal de quisto de *Globodera rostochiensis*, que não é evidente para diferenciar as espécies de *Globodera*.

**Figura 32** – Juvenil do segundo estágio de *Globodera pallida*.

**Figura 33** – Juvenil do segundo estágio de *Globodera rostochiensis*.

**Figuras 34 e 35** – Região da cabeça do juvenil do segundo estágio de *Globodera rostochiensis*.

**Figuras 36 e 37** – Região da cabeça do juvenil do segundo estágio de *Globodera pallida*.

**Figura 38** – Bolbos basais do estilete do juvenil do segundo estágio de *Globodera rostochiensis*.

**Figura 39** – Bolbos basais do estilete do juvenil do segundo estágio de *Globodera pallida*.

**Figura 40** – Cauda do juvenil do segundo estágio de *Globodera rostochiensis*.

**Figura 41** – Cauda do juvenil do segundo estágio de *Globodera pallida*.

**Figura 42** – Gel de agarose 1,5 % dos produtos amplificados com as diferentes versões de PCR.

**Figura 43** – Gel de agarose 1,5 % dos produtos amplificados com o conjunto de primers ITS5/PITSp4+PITSr3.

**Figura 44** – Gel de agarose 1,5 % dos produtos amplificados com o conjunto de primers ITS5/PITSp4+PITSr3.

**Figura 45** – Gel de agarose 1,5 % dos produtos amplificados com o conjunto de primers ITS5/PITSp4+PITSr3.

**Figura 46** – Método de isolamento de quistos com solventes orgânicos.

## **Lista de Siglas**

**CABI** - Centre for Agricultural Bioscience International

**DGAV** - Direção Geral de Alimentação e Veterinária

**DNA** - Desoxyribonucleic acid; Ácido desoxirribonucleico

**dNTP** - Desoxirribonucleotídeo fosfatado

**EPPO** - European and Mediterranean Plant Protection Organization; Organização Europeia e Mediterrânica para a Proteção das Plantas

**INE** – Instituto Nacional de Estatística

**INIAV** - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.

**ITS** - Internal Transcribed Spacer; Espaço Interno Transcrito

**J1** – Juvenil do primeiro estádio

**J2** – Juvenil do segundo estádio

**LSU** – Large subunit, Subunidade maior do DNA ribossómico

**MgCl<sub>2</sub>** – Cloreto de magnésio

**NVWA** - Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority

**bp** - Base pairs; Pares de bases

**PCR** - Polymerase Chain Reaction; Reação em Cadeia da Polimerase

**rDNA** - DNA ribossomal

**RFLP** – Restriction Fragment Length Polymorphism; Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição

**RNA** - Ribonucleic acid; Ácido ribonucleico

**rRNA** - RNA ribossomal

**SSU** – Small subunit; Subunidade pequena do DNA ribossómico

## 1. Introdução

### 1.1. *Globodera rostochiensis*, *Globodera pallida* e a cultura da batateira

Os nemátodes são um grupo de animais vermiformes que podem ser encontrados em praticamente todos os ambientes, mas apenas 25 % das espécies conhecidas são parasitas, das quais 15 % são parasitas de animais e 10 % parasitas de plantas (Melo, 1995). Os nemátodes parasitas de plantas (nemátodes fitoparasitas), maioritariamente de reduzidas dimensões, caracterizam-se por ter uma estrutura de alimentação especializada, o estilete, que é utilizado para introduzir enzimas nas células de plantas e em seguida extrair o seu conteúdo, causando elevados prejuízos às culturas agrícolas (Eisenback & Rammah, 1987; Coyne *et al.*, 2007).

Os prejuízos causados por nemátodes fitoparasitas dependem de uma grande variedade de fatores, tais como a densidade populacional, a virulência da espécie e a resistência (capacidade da planta para reduzir a população do nemátode) ou tolerância (capacidade da planta para produzir apesar do ataque de nemátodes) da planta hospedeira (Coyne *et al.*, 2007).

Um grupo economicamente importante de nemátodes fitoparasitas são os nemátodes de quisto que se encontram presentes em todo o mundo, em particular os nemátodes de quisto da batateira, que podem ser devastadores para a cultura da batata (*Solanum tuberosum* L.) se não forem controlados atempadamente, conduzindo ao abandono de vastas áreas de produção (Van Riel & Mulder, 1998; Yu *et al.*, 2010; Van de Vossenberg *et al.*, 2014).

A batata é uma planta perene da família das solanáceas, geralmente tem entre 0,6 e 1,0 m de altura, possui flores e frutos e produz um tubérculo comestível rico em amido. Atualmente é o quarto alimento mais consumido do mundo depois do milho, do trigo e do arroz, com milhares de variedades de diferentes cores, sabores e tamanhos (Globalagrinar, 2015). Por este motivo é tão importante a sua preservação enquanto cultura, sendo a adoção de medidas de proteção fitossanitária da máxima relevância de modo a controlar os nemátodes de quisto da batateira ou a impedir a sua dispersão.

Os nemátodes de quisto da batateira devem a sua designação ao facto do corpo da fêmea de ambas as espécies, após a sua morte, se transformar num quisto, que desempenha uma função essencial na sobrevivência destes nemátodes

(DGAV, 2015a). Esta designação tem sido utilizada para englobar duas espécies, *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923) Behrens, 1975 e *Globodera pallida* (Stone, 1973) Behrens, 1975. A caracterização taxonómica do género *Globodera* é apresentada no Quadro 1.

**Quadro 1** – Caracterização taxonómica do género *Globodera* (EPPO, 2013a)

Reino	Filo	Ordem	Família	Género
Metazoa	Nematoda	Tylenchida	Heteroderidae	<i>Globodera</i>

Os nemátodes *G. rostochiensis* e *G. pallida* são considerados organismos nocivos de quarentena, descritos nas Diretivas da União Europeia 2000/29/CE (Anexo 11/A2) de 8 de maio de 2000 e 2009/7/CE de 10 de fevereiro de 2009 e fazem igualmente parte da Lista A2 da EPPO (organismos de quarentena já presentes na região EPPO, nº A2/125 e A2/124, respetivamente) (EPPO, 2015). Estas espécies estão regulamentadas pela Diretiva Europeia 2007/33/EC sobre o controlo dos nemátodes de quisto da batateira e encontram-se sujeitas a medidas regulamentares rigorosas quando detetadas isoladamente ou em conjunto (EPPO, 2013a, 2015; DGAV, 2015a).

A espécie *G. rostochiensis* foi descrita inicialmente por Wollenweber, em 1923, como *Heterodera rostochiensis*, na localidade de Tessin, Mecklenburg, na Alemanha e tendo como hospedeiro *S. tuberosum* (Wollenweber, 1923). Em 1973, Stone descreveu uma segunda espécie de nemátode de quisto da batateira, *H. pallida*, originalmente considerada como um patótipo de *H. rostochiensis* (da mesma espécie, mas com capacidade patogénica diferente); mas mais tarde viria a ser descrita como *Globodera pallida* (Stone, 1973). Mais recentemente foi descoberta uma nova espécie de nemátode de quisto associada à cultura da batata, *G. ellingtonae* Handoo, Carta, Skantar and Chitwood, 2012, no Oregon, USA (Handoo *et al.*, 2012) mas cuja importância não está ainda estabelecida (Lax *et al.*, 2014; Zasada *et al.*, 2013, 2015).

As espécies *G. rostochiensis* e *G. pallida* são originárias da cordilheira dos Andes, sul do Peru, mas já se encontram disseminadas a nível mundial (Grenier *et al.*, 2010; DGAV, 2015a). Pensa-se que foram introduzidas na Europa através de tubérculos de batata que transportariam solo infestado na superfície (CABI, 2016a). Em Portugal, a espécie *G. rostochiensis* foi assinalada pela primeira vez em 1956, num campo de batata-semente próximo de Bragança (Macara, 1963) e

atualmente encontra-se presente em todas as regiões produtoras de batata do país (Cunha *et al.*, 2004; DGAV, 2015a). Já *G. pallida* foi identificada pela primeira vez em território nacional em 1988 (Santos & Fernandes, 1988).

Em Portugal, a cultura da batata tem uma grande importância social e económica, uma vez que é cultivada em todo o território nacional, preferencialmente em locais cujas temperaturas não sofram grandes amplitudes e, sobretudo, onde a ocorrência de geadas seja nula. As áreas de produção mais representativas são Bragança, Chaves, Aveiro, Viseu, Oeste e Montijo. As regiões de Aveiro, Oeste e Montijo produzem de julho a fevereiro, nas zonas de Chaves e Viseu de setembro a maio e na zona de Bragança de meados de dezembro a fins de abril (Globalagrinar, 2015). Os valores indicativos da produção nacional, entre 2011 e 2015, encontram-se descritos no Quadro 2.

**Quadro 2** – Valores indicativos da produção nacional de batata (INE, 2013, 2014, 2016a, 2016b)

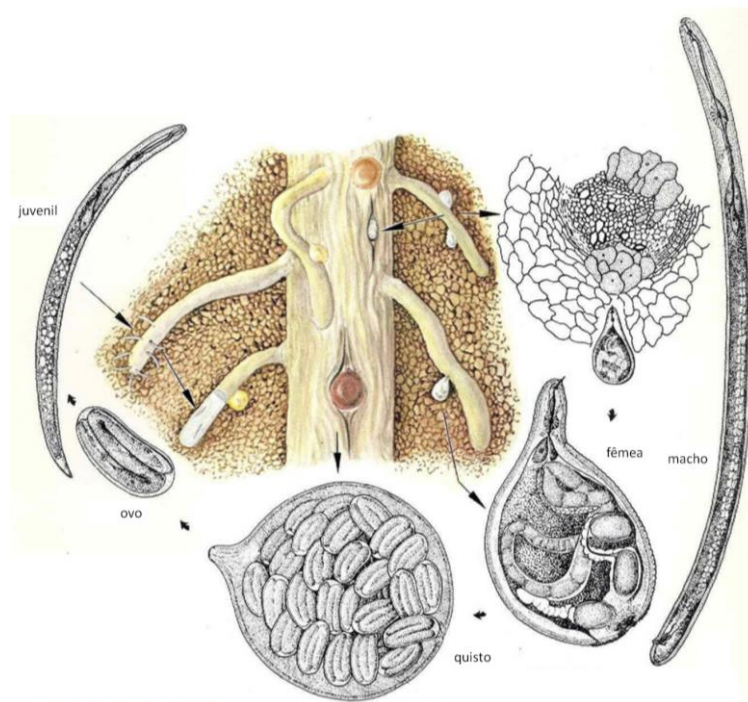
Ano	2011	2012	2013	2014	2015
Produção (ton)	389 800	445 649	487 646	539 824	486 790
Área (ha)	26 501	25 052	26 758	27 213	24 622

Como os nemátodes de quisto da batateira representam um risco para a cultura da batata em Portugal e em todo o território comunitário, foi estabelecido o programa nacional de prospeção dos nemátodes de quisto da batateira, que se encontra descrito no Decreto-Lei n.º 87/2010, de 16 de Julho, que transpõe a Diretiva n.º 2007/33/CE, do Conselho, de 11 de Junho, e vem criar um novo enquadramento das medidas de proteção fitossanitária destes organismos nocivos, com o objetivo de proteger as produções nacionais de batata, evitar a sua dispersão no território nacional e comunitário e assegurar uma produção de batata com garantias de qualidade para os consumidores.

Em 2014, dos 745 campos prospetados, 52 apresentaram amostras positivas. As análises laboratoriais permitiram identificar parcelas contaminadas com as duas espécies de *Globodera* e outras apenas com uma das espécies (DGAV, 2015a).

## 1.2. Ciclo de vida dos nemátodes de quisto da batateira

*Globodera rostochiensis* e *G. pallida* são endoparasitas sedentários das raízes dos seus hospedeiros, caracterizados por acentuado dimorfismo sexual. O seu ciclo de vida (Figura 1) compreende a fase de ovo, quatro estádios juvenis separados por quatro mudas que precedem o estado adulto, do macho e da fêmea (Mota, 1989a).



**Figura 1** – Ciclo de Vida de *Globodera rostochiensis* (Paap, 2013).

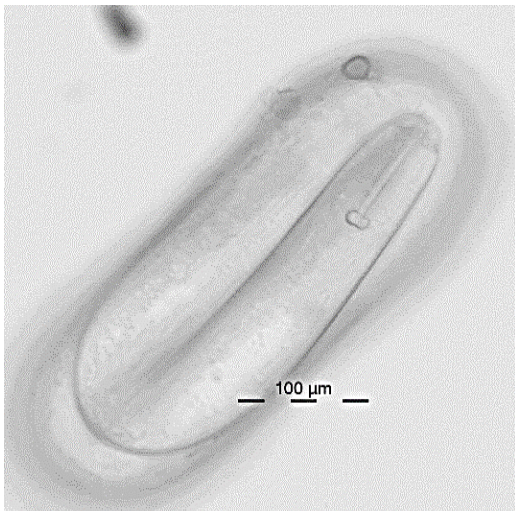
O ciclo de vida inicia-se com a formação dos ovos no interior dos quistos (Figura 2), que irão dar origem à próxima geração. No interior de cada ovo ocorre a primeira muda formando-se os juvenis do primeiro estágio (J1) (Mota, 1989a).



**Figura 2** - Quisto de *Globodera rostochiensis* com ovos no interior.



Os juvenis, já dotados de estilete, quando estimulados pelos exsudados emitidos pelas raízes de uma planta hospedeira eclodem dos ovos como juvenis do segundo estágio (J2) (Perry & Beane, 1988; Mota, 1989a) (Figuras 3 e 4). A temperatura é outro fator que também influencia a emergência dos juvenis (Jones & Parrot, 1969; Franco, 1979): na espécie *G. pallida* os J2 eclodem por volta dos 10° C ou menos e desenvolvem-se a temperaturas baixas entre 10 e 18° C, enquanto que a espécie *G. rostochiensis* parece estar melhor adaptada a uma gama de temperaturas de 15 a 25° C (Franco, 1979). Outros fatores que afetam a eclosão são a humidade do solo, o arejamento e o pH (Shepherd & Clarke, 1971).



**Figura 3** – Juvenil do segundo estágio imediatamente antes de eclodir do ovo.



**Figura 4** – Juvenil do segundo estágio a eclodir do ovo.

Os juvenis do segundo estágio após eclodirem do quisto, são atraídos para as raízes da planta hospedeira, devido à presença de exsudados radiculares que são libertados no solo durante o desenvolvimento da raiz (Perry, 1998). Com o auxílio do estilete penetram na raiz da planta hospedeira e progridem entre as células, até se imobilizarem no cilindro central da raiz, onde vão estabelecer um local de alimentação (sincício), que passará a ser a sua fonte de nutrientes. Durante estas fases sofrem várias mudas, ao longo de quatro semanas, ao fim das quais se transformam em machos ou fêmeas adultos (Mota, 1989a; EPPO, 2013a).

Os machos mantêm a configuração vermiforme e têm vida livre e curta no solo (cerca de 10 dias após terem deixado a raiz), tempo em que procuram fecundar o maior número de fêmeas disponível. Neste ponto do ciclo de vida, as fêmeas alimentam-se e excretam hormonas que atraem os machos para serem fecundadas (Green & Miller, 1969; Green & Plumb, 1970; Mugniery, 1979; Mugniery *et al.*, 1992). Após a fecundação, aumentam de tamanho devido ao

desenvolvimento dos ovos e rompem a epiderme da raiz, ficando com a parte anterior do corpo no interior da raiz e a parte posterior do corpo no exterior. São visíveis a olho nu, sob a forma de pequenas estruturas globosas. As fêmeas de *G. rostochiensis* apresentam uma coloração branca seguida de amarelo dourado e as de *G. pallida* são de cor branca ou branca pérola. Quando os ovos atingem o seu desenvolvimento completo as fêmeas de ambas as espécies morrem, a cutícula torna-se mais espessa e o corpo da fêmea transforma-se num quisto, de parede dura, castanha e resistente à seca (Mota, 1989a; Heitor, 2006).

Um quisto pode conter entre 100 a 500 ovos que podem eclodir imediatamente ou permanecer em estado latente e conservar a sua capacidade reprodutiva por muitos anos. Alguns ovos são capazes de sobreviver dentro do quisto por 30 anos, embora nessa altura poucos estejam viáveis (Perry & Beane, 1988).

Quando as condições ambientais voltam a ser propícias, os nemátodes de quisto da batateira dão início a um novo ciclo. Estas espécies completam o seu ciclo de vida entre 5 a 7 semanas (Fleming & Powers, 1998).

### **1.3. Propagação e dispersão**

Os quistos são a fase mais resistente e facilmente transportável no ciclo de vida destes nemátodes, e podem ser encontrados entre as partículas do solo, nas raízes e nos tubérculos do hospedeiro. O tamanho microscópico do quisto dificulta a sua deteção no solo infestado e proporciona a sua disseminação (Henriques, 2012).

A disseminação destes nemátodes a grandes distâncias é assegurada principalmente através de solo infestado aderente aos tubérculos, às raízes das plantas, ao calçado, à maquinaria agrícola e às embalagens. No entanto, fenómenos naturais como o vento, a chuva e águas de escoamento superficial são também capazes de dispersar quistos viáveis (Heitor, 2006; Henriques, 2012; EPPO, 2013a).

Por outro lado, sabe-se ainda que os nemátodes de quisto são capazes de passar através do trato digestivo dos animais que pastoreiam em campos infestados e são excretados intactos numa condição viável pronta para começar uma nova infestação. Os cascos dos animais, se transportarem detritos do solo infestado, também podem veicular quistos de uma área para outra (Brodie, 1976).

#### 1.4. Sintomas

O efeito do ataque de nemátodes sobre a produção de batata depende da densidade de nemátodes presentes no solo e da capacidade que a planta tem para tolerar os efeitos do ataque (Henriques, 2012).

Durante o período vegetativo, a presença de nemátodes de quisto nas parcelas atacadas traduz-se pela observação de focos, mais ou menos circulares, em que as plantas apresentam uma coloração anormal da folhagem, folhas pequenas e com tendência a murchar, principalmente durante as horas mais quentes do dia, murchidão que se mantém após a rega. Há redução do número de caules, da dimensão dos folíolos e do número de raízes. As folhas da base do caule ficam murchas, as folhas superiores enrolam e apresentam manchas castanhas nas margens dos folíolos (Figuras 5 e 6). As raízes podem ter lesões castanhas e ramificações anormais, podendo haver uma proliferação de raízes laterais ou evidenciar uma deterioração avançada, não havendo normalmente resposta à fertilização. Pode observar-se uma maior densidade de ervas daninhas, devido à planta infestada pelo nemátode ser menos capaz de competir com as infestantes. Os tubérculos das plantas atacadas são mais pequenos e em menor número do que os das plantas sãs e à superfície podem-se observar pequenas lesões que os podem tornar não comercializáveis, comprometendo o rendimento da cultura. Por outro lado, as plantas podem senescer prematuramente e pode haver uma maior incidência de outras doenças, devido à resistência suprimida das plantas infestadas pelos nemátodes (Mota, 1989a; Heitor, 2006; Coyne *et al.*, 2007; Henriques, 2012; EPPO, 2013a; DGAV, 2015a).



**Figura 5** – Sintomas de ataque de *Globodera*. (folhas da base do caule murchas).



**Figura 6** – Sintomas de ataque de *Globodera* (folhas superiores enroladas e com manchas nas margens dos folíolos).

No entanto, é importante salientar que estes sintomas não são específicos da infestação de nemátodes, podendo ser confundidos com a sintomatologia de outros stresses abióticos ou bióticos. Para confirmar se esses sintomas são causados por nemátodes de quisto da batateira, devem ser observados quistos nas raízes do hospedeiro ou devem ser detetados quistos nas análises das amostras de solo (Mota, 1989a; Heitor, 2006; Coyne *et al.*, 2007; Henriques, 2012).

### **1.5. Detecção e identificação**

A forma mais segura de detetar nemátodes de quisto da batateira é através da análise de solo. Assim, todos os campos que tenham tido batata, ou que venham a ter, devem ser analisados regularmente. Se houver detecção destes fitoparasitas, deve-se determinar ainda o grau de infestação (Heitor, 2006; EPPO, 2013a). Também pode ser feita uma análise visual para verificar a presença de quistos nas raízes, uma vez que as fêmeas jovens e os quistos são visíveis a olho nu como minúsculos pontos brancos, amarelos ou acastanhados sobre a superfície da raiz. No entanto, a detecção por desenraizamento das plantas é problemática, uma vez que os quistos podem ser facilmente perdidos durante a operação do levantamento. A análise do solo é, portanto, a melhor maneira de determinar a presença de nemátodes de quisto da batateira (EPPO, 2013a).

É, então, necessário planear a recolha de amostras de solo que vão ser enviadas para análise laboratorial. Segundo o Anexo II do Decreto-Lei n.º 87/2010, de 16 de julho, a amostra deve ser constituída por uma colheita de um volume de solo com uma dimensão padrão de, pelo menos, 1500 ml de solo/ha, colhida em, pelo menos, 100 tomas/ha, de preferência numa malha retangular, de largura não inferior a 5 m e comprimento não superior a 20 m entre pontos de amostragem, que abranja a totalidade do campo.

A amostra deve ser posteriormente encaminhada o mais rápido possível para o laboratório e ser armazenada a cerca de 5º C (EPPO, 2013a).

#### **1.5.1. Métodos de extração**

Os métodos de extração de nemátodes têm em conta diferentes aspetos: o tamanho, a forma, a mobilidade e a densidade específica dos nemátodes. Estes itens levam a uma variedade de métodos de extração de nemátodes, descritos

nos protocolos de diagnóstico da EPPO, nomeadamente os empregues para a detecção de *Globodera* sp, PM 7/119 (1) *Nematode extraction* (EPPO, 2013b) e PM 7/40 (3) *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* (EPPO, 2013a). No entanto, é permitido modificar os métodos descritos, desde que as alterações propostas estejam de acordo com o objetivo dos protocolos de diagnóstico da EPPO (EPPO; 2013b).

A maioria dos métodos de extração de quistos baseia-se no facto de que os quistos secos contêm ar, fazendo com que flutuem na superfície da água. Para uma boa recuperação dos quistos, o solo deve estar seco e deve ser passado por um crivo de 4 mm de malha para remover o material mais grosseiro do solo. Para se obter uma amostra representativa utiliza-se normalmente uma quantidade de solo seco de 200 g, podendo variar entre 100-500 g (Marks & Brodie, 1998; Van Bezooijen, 2006).

As amostras de solo podem ser secas à temperatura ambiente ou em estufa. Este processo é essencial para a eficiência do diagnóstico, porque se não for bem executado pode levar a resultados falso-negativos. A secagem do solo pode prejudicar a viabilidade dos conteúdos dos quistos, especialmente quando realizada a temperaturas muito elevadas ou de forma não gradual: as amostras de solo não devem ser secas a uma temperatura superior a 30° C e não inferior a 40 % de humidade do ar (EPPO, 2013a, 2013b).

Deve ser sempre reservada uma subamostra antes da secagem do solo (Van Bezooijen, 2006), armazenada a cerca de 5° C (EPPO, 2013a), para que se possa fazer uma repetição da extração, se necessário.

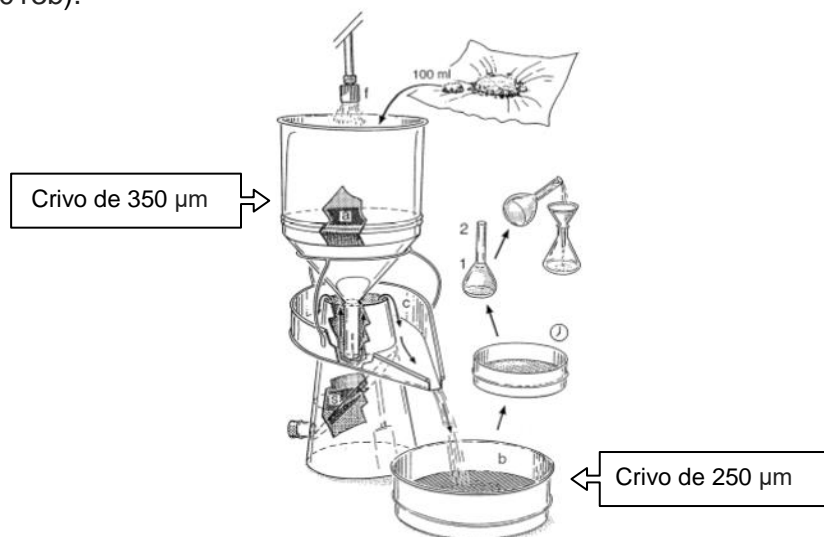
Dos vários métodos descritos, o indicado pela EPPO para a extração de quistos é o método de Fenwick (Anexo I). No entanto na bibliografia publicada também é utilizado o método de decantação e crivagem de Cobb (Anexo II) para extrair quistos do solo (Mota, 1989b; Mota & Eisenback, 1993a, 1993b; Van Bezooijen, 2006; Berger, 2007; Coyne *et al.*, 2007; Skantar *et al.*, 2007, 2011).

- **Extração de nemátodes de quisto através do método de Fenwick**

O levigador de Fenwick é um aparelho amplamente utilizado para a extração de quistos que foi originalmente descrito por Fenwick (1940) e modificado por

Oostenbrinck (1950). Trata-se de um recipiente, afunilando na direção do topo, com um colar inclinado, que recolhe o fluxo de água que transborda e o dirige para uma saída. O levigador tem uma base inclinada, com um ponto de drenagem na zona mais baixa. Este método é adequado para amostras de solo secas até 300 g. Tem como vantagens permitir o processamento de uma grande quantidade de amostras e recuperar um grande número de quistos, mas as amostras de solo devem ser previamente secas (podendo danificar os nemátodes) e é despendida uma grande quantidade de água (Fenwick, 1940; Oostenbrinck, 1950; Van Bezooijen, 2006; EPPO 2013a; EPPO, 2013b).

O método de Fenwick (anexo I) faz uso das propriedades de flutuação dos quistos secos e da diferença de tamanho entre estes e outras frações da amostra. Neste método, o material grosseiro da amostra é retido no crivo de 350  $\mu\text{m}$  que se encontra no topo do levigador; a restante amostra passa através do tubo do funil para o fundo do levigador. Nesta fase, as partículas finas e leves, como os quistos, começam a subir por flutuação até transbordarem para o colar do levigador e finalmente caem num crivo de 250  $\mu\text{m}$ , cuja malha é mais apertada do que o diâmetro dos quistos, que os retém (Figura 7) (Van Bezooijen, 2006; EPPO 2013a, 2013b).



**Figura 7** – Método de Fenwick para extração de quistos de amostras de solo secas, seguido de isolamento com solvente orgânico (adaptado de Van Bezooijen, 2006).

A eficácia da extração de quistos geralmente diminui com o aumento do teor de matéria orgânica do solo. Nenhum dos métodos descritos pela EPPO fornece uma separação satisfatória de quistos dos restantes detritos orgânicos e de solos com alto teor de turfa (EPPO, 2013b). No entanto, os quistos podem posteriormente

ser isolados do resto do material flutuante através dos seguintes procedimentos (Van Bezooijen, 2006; EPPO, 2013a; EPPO, 2013b):

- Passar a amostra para uma caixa de Petri e, sob uma lupa binocular, separar os quistos manualmente;
- Secar a amostra em papel de filtro e, sob uma lupa binocular, separar os quistos manualmente;
- Utilizar o método de flutuação-centrífuga para quistos;
- Secar a amostra e isolar os quistos através de solventes orgânicos;
- Deixar a amostra sedimentar e adicionar uma gota de detergente, que fará com que os quistos se desloquem para a borda do copo de vidro e assim serem recolhidos.

- **Extração de nemátodes através do método de decantação e crivagem de Cobb**

O método de decantação e crivagem de Cobb (1918) (anexo II) é utilizado para a extração de nemátodes móveis do solo (EPPO, 2013b), no entanto também é possível extrair nemátodes de quisto com este método (Mota, 1989b; Mota & Eisenback, 1993a, 1993b; Van Bezooijen, 2006; Berger, 2007; Coyne *et al.*, 2007; Skantar *et al.*, 2007, 2011).

O método faz uso das diferenças existentes no tamanho, na forma, na mobilidade dos nemátodes e na taxa de sedimentação dos nemátodes e das partículas do solo. A amostra é suavemente agitada num recipiente cheio de água, separando os nemátodes das partículas do solo. As partículas pesadas sedimentam e a suspensão de nemátodes é decantada e passada por um conjunto de crivos, aonde ficam retidos. Este método de crivagem é realizado com uma série de crivos de malha decrescente em tamanho (1000-500 µm, 375-350 µm, 175 µm, 100 µm, 45 µm), de modo a que os nemátodes de tamanho diferente sejam recolhidos separadamente (Mota, 1989b; Van Bezooijen, 2006; Coyne *et al.*, 2007; EPPO, 2013b).

A vantagem de se utilizar o método de decantação e crivagem de Cobb é que num só procedimento é possível fazer a extração de nemátodes de quisto e de formas móveis, poupando assim tempo e água. No entanto, Marks & Brodie (1998) defendem que apenas cerca de 70 % dos quistos podem ser recuperados através do método de decantação e crivagem, não devendo ser utilizado em

análises de rotina. Outra desvantagem deste método é que os quistos cheios de ovos não flutuam rapidamente, enquanto que os quistos vazios ou parcialmente vazios são recuperados, resultando numa subestimação da população. Coyne et al. (2007) também partilham esta opinião.

- **Extração de nemátodes através do método de flutuação centrífuga**

O método de flutuação centrífuga (anexo III) é utilizado para a extração de nemátodes do solo, sedimentos e outros substratos. Este método tem em conta a diferença da densidade específica dos nemátodes e da restante fração da amostra. Se a amostra está numa suspensão aquosa cuja densidade específica é mais elevada relativamente à dos nemátodes, estes flutuam e as partículas cuja densidade específica é mais elevada que a da suspensão aquosa, precipitam. O método envolve dois passos. No primeiro passo, uma suspensão aquosa de nemátodes, ainda contendo partículas, é centrifugada. As partículas com uma densidade específica superior a 1 (incluindo nemátodes) precipitam e o sobrenadante pode ser decantado. No segundo passo, é adicionado um fluido de extração com uma densidade específica mais elevada que a dos nemátodes. Após centrifugação, os nemátodes flutuam no sobrenadante, enquanto que a maioria das outras partículas vai precipitar. O sobrenadante é depois lavado num crivo de malha fina e passado para um copo de vidro, para posterior observação à lupa binocular (Mota, 1989b; Van Bezooijen, 2006; EPPO, 2013b).

Soluções de açúcar, sulfato de magnésio ou de zinco são muitas vezes utilizadas como fluido de extração. As soluções de açúcar parecem ser uma opção mais económica, mas não podem ser reutilizadas, tornam a solução muito pegajosa, podem ficar facilmente contaminadas e o valor osmótico é tão elevado que muitos nemátodes podem não sobreviver. A solução de sulfato de zinco tem um valor osmótico inferior às soluções de açúcar, mas é ácida e tóxica. O sulfato de magnésio tem a vantagem de poder ser reutilizado, mas é mais dispendioso do que as soluções de açúcar (Mota, 1989b; Van Bezooijen, 2006; EPPO, 2013b).

Para manter nemátodes a flutuar, a densidade específica do fluido tem de ser pelo menos igual a 1,084, a densidade específica dos nemátodes (vivos). No entanto, se se aumentar a densidade específica do líquido de extração isso não corresponde necessariamente a um aumento da eficiência de extração, uma vez que há um aumento da tensão osmótica que pode danificar os nemátodes e



mantém também mais partículas a flutuar (Mota, 1989b; Van Bezooijen, 2006; EPPO, 2013b).

A grande vantagem do método de flutuação centrífuga é que é também adequado para a extração de nemátodes de reduzida mobilidade, desde que não muito longos. A amostra pode ser extraída dentro de uma hora e o resultado é uma suspensão de nemátodes relativamente limpa de detritos. No entanto, o fluido de extração pode ter efeitos negativos sobre os nemátodes, tornando a identificação mais difícil (Van Bezooijen, 2006).

- **Isolamento de quistos através de solventes orgânicos**

Uma grande parte da matéria orgânica que se encontra nas amostras pode ser removida, isolando os quistos através da adição de um solvente orgânico (etanol a 96 % ou acetona) (anexo IV), por forma a facilitar a sua observação. É um método rápido, simples e relativamente barato. No entanto, os solventes orgânicos têm desvantagens (inflamabilidade e/ou toxicidade) (Marks & Brodie, 1998; Van Bezooijen, 2006; EPPO, 2013b).

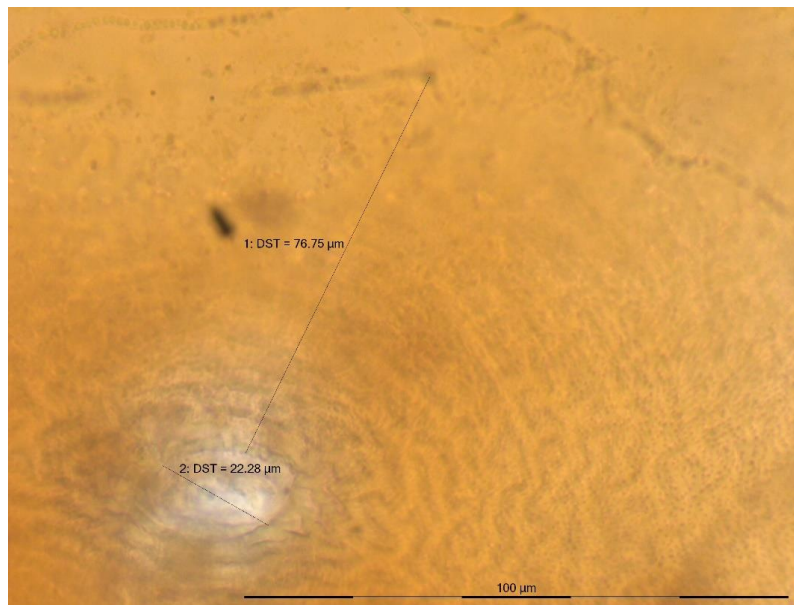
### **1.5.2. Identificação das espécies *Globodera rostochiensis* e *Globodera pallida***

A identificação das espécies *G. rostochiensis* e *G. pallida*, por métodos morfológicos e moleculares, está prevista nos protocolos da EPPO PM 7/40 (3) *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* (EPPO, 2013a). Adicionalmente, existe muita bibliografia publicada que pode ser uma boa fonte de informação complementar aos protocolos da EPPO.

- **Identificação morfológica**

As espécies *G. rostochiensis* e *G. pallida* são muito semelhantes e a sua morfologia, bem como a gama de hospedeiros podem dificultar o seu diagnóstico. A identificação destas espécies é baseada na combinação de características morfológicas e morfométricas do quisto: diâmetro da vulva, distância vulva/ânus, quociente de Granek (razão entre a distância vulva/ânus e o diâmetro da vulva), o padrão vulvar e o número de pregas entre a vulva e o ânus, e do juvenil do segundo estágio (J2): comprimento total, comprimento do estilete, forma dos

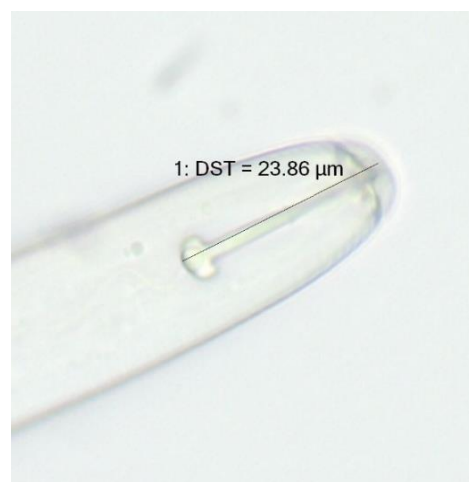
bolbos basais, comprimento da cauda e comprimento da parte hialina (Figuras 8, 9, 10, 11 e 12) (Mota, 1989a; Bacic *et al.*, 2013; EPPO, 2013a).



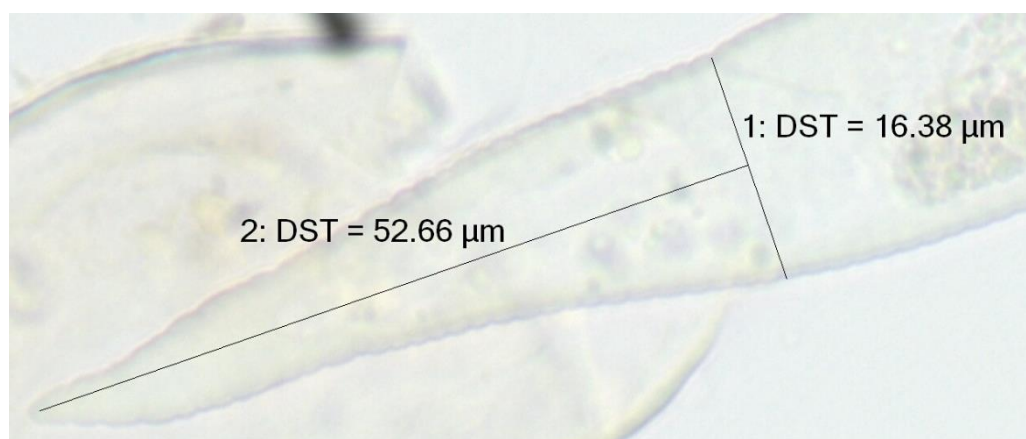
**Figura 8** – Medição do diâmetro da vulva e da distância vulva-ânus.



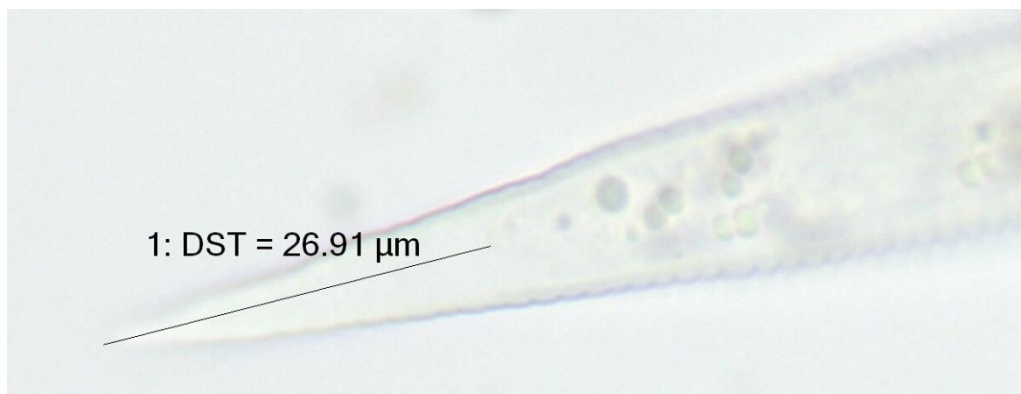
**Figura 9** – Medição do comprimento do corpo.



**Figura 10** – Medição do comprimento do estilete.



**Figura 11** – Medição do comprimento da cauda.



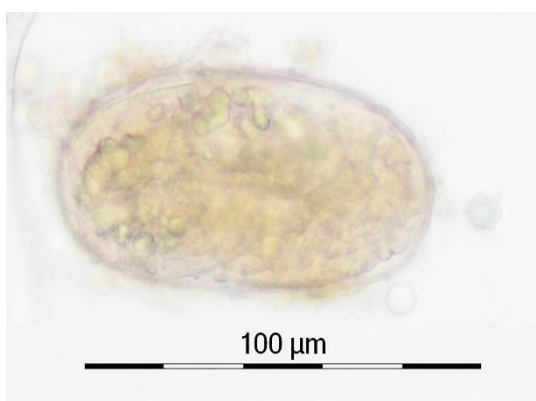
**Figura 12** – Medição do comprimento da parte hialina da cauda.

#### **- Ovos**

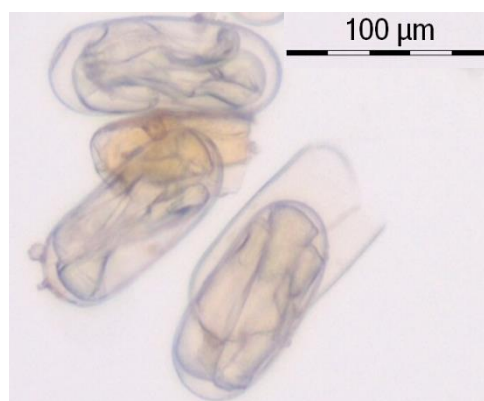
Como já referido, os ovos de *G. rostochiensis* e de *G. pallida* formam-se e ficam armazenados no interior dos quistos.

A superfície dos ovos é macia, transparente e sem microvilosidades. O juvenil do primeiro estágio encontra-se enrolado e preenche a totalidade do ovo e, às vezes, é possível distinguir a região labial e o estilete do juvenil do segundo estágio imediatamente antes de eclodir (EPPO, 2013a; CABI, 2016a; CABI, 2016b) (Figura 3).

Quando os ovos se encontram danificados, rasgados ou vazios, não estão viáveis. Nesse caso, a superfície não é macia e o conteúdo tem um aspeto granuloso (Figura 13), enegrecido e os juvenis apresentam-se deteriorados e/ou sem estruturas visíveis (Figura 14) (EPPO, 2013a).



**Figura 13** – Ovo com conteúdo granuloso.



**Figura 14** – Ovos com os juvenis deteriorados.

No Quadro 3 apresentam-se as características morfométricas referidas para os ovos destas duas espécies.

**Quadro 3** – Características morfométricas dos ovos de *Globodera rostochiensis* e de *Globodera pallida* (CABI, 2016a, 2016b)

Característica	<i>G. rostochiensis</i>	<i>G. pallida</i>
Comprimento do ovo	101-104 $\mu\text{m}$	108,3 $\pm$ 2,0 $\mu\text{m}$
Largura do ovo	46-48 $\mu\text{m}$	43,2 $\pm$ 3,2 $\mu\text{m}$

#### - Juvenil do segundo estágio

O juvenil do segundo estágio (J2) é vermiforme e afunilando nas extremidades (Figura 15); a cavidade do corpo estende-se até ao ânus e termina numa cauda cônica.

A cabeça é compensada e arredondada. O estilete é forte e os bolbos basais são projetados posteriormente em *G. rostochiensis* e projetados anteriormente em *G. pallida*. O bolbo médio (*metacarpus*) está bem desenvolvido, tem uma forma elíptica e uma grande válvula central. O anel nervoso está localizado à



**Figura 15** – Juvenil de segundo estágio.

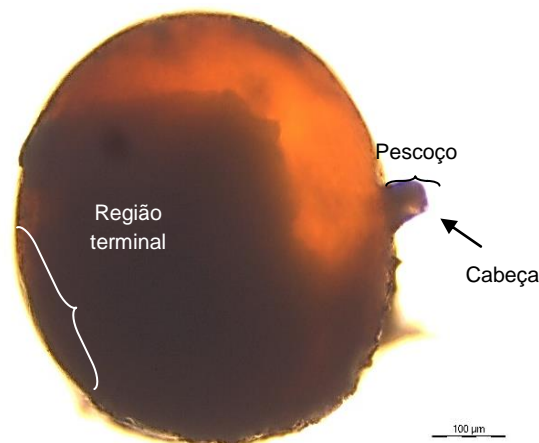
volta do esófago, o poro excretor fica a cerca de 110  $\mu\text{m}$  a partir da cabeça e o hemizonóide (órgão sensorial) encontra-se posterior ao poro excretor. O primórdio genital está localizado a 60 % do comprimento do corpo a partir da ponta da cabeça (CABI, 2016a, 2016b; EPPO, 2013a). Os parâmetros morfométricos dos juvenis do segundo estágio destas duas espécies encontram-se no Quadro 4.

**Quadro 4** – Características morfométricas dos juvenis do segundo estágio de *Globodera rostochiensis* e *Globodera pallida* (CABI, 2016a, 2016b)

Característica	<i>G. rostochiensis</i>	<i>G. pallida</i>
Comprimento do corpo	468 $\pm$ 100 $\mu\text{m}$	486 $\pm$ 2,8 $\mu\text{m}$
Largura do corpo no poro excretor	18 $\pm$ 0,6 $\mu\text{m}$	19,3 $\pm$ 0,9 $\mu\text{m}$
Comprimento do estilete	22 $\pm$ 0,7 $\mu\text{m}$	23,0 $\pm$ 1,0 $\mu\text{m}$
Comp. da cabeça à válvula do bolbo médio	69 $\pm$ 2,0 $\mu\text{m}$	68,7 $\pm$ 2,7 $\mu\text{m}$
Comp. da cabeça ao poro excretor	100 $\pm$ 2,0 $\mu\text{m}$	108,6 $\pm$ 4,1 $\mu\text{m}$
Comprimento da cauda	44 $\pm$ 12 $\mu\text{m}$	51,1 $\pm$ 2,8 $\mu\text{m}$
Largura da cauda no ânus	11,4 $\pm$ 0,6 $\mu\text{m}$	12,1 $\pm$ 0,4 $\mu\text{m}$
Comprimento da parte hialina	26,5 $\pm$ 2,0 $\mu\text{m}$	26,6 $\pm$ 4,1 $\mu\text{m}$

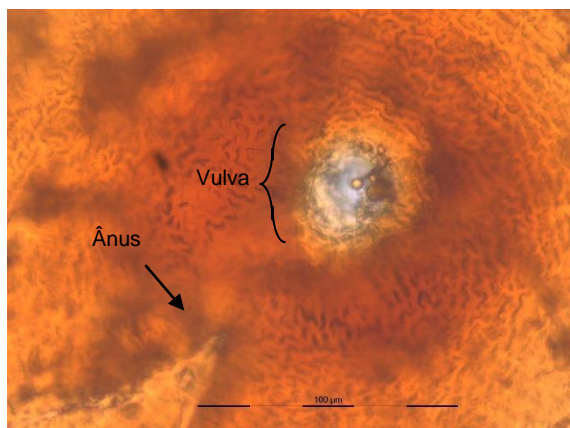
### - Fêmeas/Quistos

Morfológicamente a fêmea adulta tem um corpo quase esférico do qual sai o pescoço e a cabeça, sem cone terminal. O poro excretor está bem definido na base do pescoço. No polo posterior da fêmea, oposto ao do pescoço, está a região terminal, onde se observa uma depressão arredondada (Figura 16).



**Figura 16** – Quisto de *Globodera rostochiensis*.

A fenda vulvar está localizada no centro desta região, numa área mais translúcida da cutícula e é constituída por duas papilas em forma de quarto crescente. Como apresenta apenas um orifício quase circular, é caracterizada como 'circunfenestrada' (Figura 17). O ânus é muitas vezes observado num ponto da cutícula em que a forma de "V" afunila para um ponto final (Figura 17). O padrão e o número de pregas vulvares encontrados na área entre o ânus e a extremidade da vulva contribuem para a identificação das espécies de *Globodera* (Figura 18) (CABI, 2016a, 2016b; EPPO, 2013a).



**Figura 17** - Região terminal de *Globodera pallida*.



**Figura 18** – Padrões vulvares (EPPO, 2013a).

Nos quistos recentes ainda se pode observar uma região terminal intacta, mas os quistos mais velhos podem ter perdido todos os sinais da sua genitália, observando-se apenas um orifício na cutícula correspondente à vulva (CABI, 2016a).

Quando se apresenta na forma vermiforme, antes de formar o quisto, a fêmea possui uma cabeça com uma estrutura hexarradiada e pouco robusta. O estilete é dividido em comprimento entre o cone e o eixo, e os bolbos basais são projetados posteriormente em *G. rostochiensis* e projetados anteriormente em *G. pallida*. O bolbo médio é grande, circular e bem desenvolvido. Os ovários são grandes e emparelhados (CABI, 2016a, 2016b). No Quadro 5 constam as características morfométricas das fêmeas/quistos de *Globodera rostochiensis* e *Globodera pallida*.

**Quadro 5** – Características morfométricas das fêmeas/quistos de *Globodera rostochiensis* e *Globodera pallida* (CABI, 2016a, 2016b)

Característica	<i>G. rostochiensis</i>	<i>G. pallida</i>
Quisto		
Comprimento do corpo	445±50 µm	534±66 µm
Comprimento, sem pescoço	382±60 µm	579±70 µm
Comprimento do pescoço	104±19 µm	188±20 µm
Distância do ânus à vulva	66,5±10,3 µm	50±13,4 µm
Diâmetro vulvar	19,0±2,0 µm	24,5±5,0 µm
Quociente de Granek	3,6±0,8	2,2±1,0
Nº de pregas vulvares (ânus/vulva)	21±3,0	12±3
Fêmea vermiforme		
Comprimento do estilete	23±1 µm	27,4±1,1 µm
Largura da cabeça na base	5,2±0,7 µm	5,2±0,5 µm
Comprimento da base do estilete ao ducto da glândula esofágica	6±1 µm	5,4±1,1 µm
Comprimento da cabeça à válvula do bolbo médio	73±14,6 µm	67,2±18,7 µm
Comprimento da válvula do bolbo médio ao poro excretor	65±2,0 µm	71,2±22 µm
Diâmetro da base vulvar	145±17 µm	139,7±15,5 µm
Comprimento da fenda vulvar	22 ± 2,8 µm	24,8±3,7 µm
Comprimento do ânus à vulva	9,7 ± 2,0 µm	11,5±1,3 µm
Comprimento da cabeça ao poro excretor	60 ± 10 µm	44,6±10,9 µm

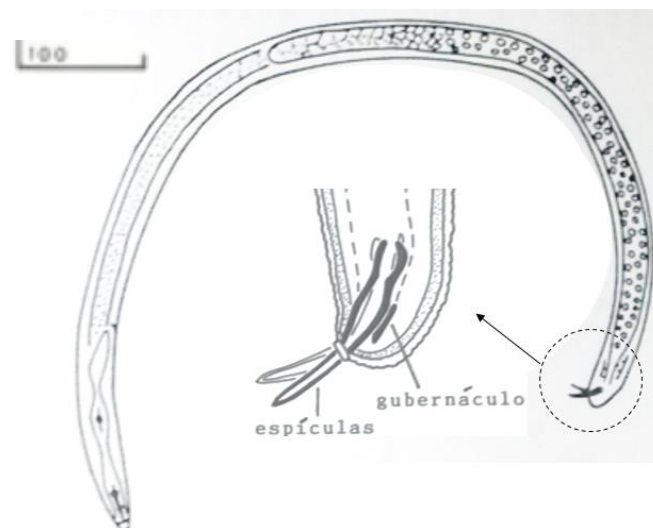
Na espécie *G. pallida* os quistos são inicialmente de coloração branca ou creme e quando amadurecem apresentam uma cor acastanhada. Por sua vez, na espécie



*G. rostochiensis* os quistos, que também são inicialmente de coloração branca, passam depois para amarelo dourado durante a maturação, até ficarem castanhos (Mota, 1989a; CABI, 2016a, 2016b; EPPO, 2013a).

#### - Machos

Os machos de *Globodera* spp. são vermiformes (Figura 19), com uma cauda curta, cônica e sem bursa (membrana caudal do macho). O *habitus* (forma do corpo relaxado, depois de morto quando passado à chama) revela uma forma curva com a região posterior torcida num ângulo de 90° com a parte restante do corpo. A cabeça é compensada, arredondada e fortemente desenvolvida. O estilete é robusto e possui bolbos basais projetados posteriormente em *G. rostochiensis* e projetados anteriormente em *G. pallida*. O bolbo médio é bem desenvolvido e tem uma grande válvula central. O anel nervoso está localizado à volta do esófago entre o bolbo médio e o intestino. O hemizonóide encontra-se posterior ao poro excretor. Possui um par de espículas (órgão copulatório) arqueadas, e são acompanhadas por um pequeno gubernáculo (estrutura guia), sem ornamentação, com cerca de 10 µm em comprimento e 2 µm de largura, que se encontra numa posição dorsal relativamente às espículas (CABI, 2016a, 2016b).



**Figura 19** - Macho de *Globodera* spp. (Adaptado de Mota (1998) e EPPO (2013a)).

As características morfométricas dos machos destas duas espécies encontram-se descritas no Quadro 6.

**Quadro 6** – Características morfométricas dos machos de *Globodera rostochiensis* e *Globodera pallida* (CABI, 2016a, 2016b)

Característica	<i>G. rostochiensis</i>	<i>G. pallida</i>
Comprimento do corpo	890 ± 1,27 µm	1200 ± 100 µm
Largura do corpo no poro excretor	28 ± 1,7 µm	28,4 ± 1,0 µm
Largura da base da cabeça	11,8 ± 0,6 µm	12,3 ± 0,5 µm
Comprimento da cabeça	7,0 ± 0,3 µm	6 ± 0,3 µm
Comprimento do estilete	26 ± 1,0 µm	27,5 ± 1,0 µm
Comprimento da base do estilete ao ducto da glândula esofágica	5,3 ± 1,0 µm	3,0 ± 1,0 µm
Comp. da cabeça à válvula do bolbo médio	98,5 ± 7,4 µm	66 ± 7,1 µm
Comprimento da válvula do bolbo médio ao poro excretor	74 ± 9µm	81,0 ± 11 µm
Comp. da cabeça ao poro excretor	172 ± 12,0 µm	176,4 ± 14,5 µm
Comprimento da cauda	5,4 ± 1,0 µm	5,2 ± 1,4 µm
Largura da cauda no ânus	13,5 ± 0,4 µm	13,5 ± 2,1 µm
Comprimento das espículas	35,0 ± 3,0 µm	36,3 ± 4,1 µm
Comprimento do gubernáculo	10,3 ± 1,5µm	11,3 ± 1,6µm

A identificação das espécies de *Globodera* com base na morfologia pode ser difícil devido à variabilidade das principais características e à sobreposição das medidas padrão nas duas espécies. À medida que a gama de valores para cada uma destas características se sobrepõe entre as espécies, é necessária maior prudência na identificação. Nestes casos, é recomendada uma confirmação com técnicas moleculares (EPPO, 2013a).

#### • Identificação molecular

Como já referido anteriormente, a identificação das espécies *G. rostochiensis* e *G. pallida* baseada em diferenças nas características morfológicas e morfométricas é muitas vezes inconclusiva, por serem espécies muito semelhantes.

Para ultrapassar esta dificuldade têm sido desenvolvidos vários métodos alternativos baseados em abordagens bioquímicas, tais como a análise de proteínas totais e isoenzimas e focagem isoeletrica (Fleming & Marks, 1982). Contudo, estas metodologias bioquímicas apenas permitem obter resultados precisos e robustos com nemátodes de um determinado estágio de desenvolvimento, o que constitui ainda uma grande limitação. Com o aparecimento da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) e das metodologias baseadas na amplificação de DNA, as abordagens moleculares,



independentes do estágio de desenvolvimento e da influência ambiental, constituem um método com aplicação generalizada na identificação de espécies, utilizando quer um único nemátode quer um quisto ou mesmo parte dele.

Vários investigadores desenvolveram ensaios baseados em métodos moleculares para diferenciar as duas espécies de nemátodes de quisto da batateira (EPPO, 2013a). Os testes moleculares recomendados pela EPPO, no anexo 3 do protocolo de diagnóstico PM 7/40 (3) *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* (EPPO, 2013a) para a identificação de quistos isolados ou indivíduos de *G. rostochiensis* e *G. pallida* são:

- Bulman & Marshall (1997), teste de PCR *multiplex* utilizando *primers* específicos para as duas espécies baseados nas sequências ribossomais 18S e ITS1;
- Fleming *et al.* (2000) ou Thiéry & Mugniéry (1996), dois testes PCR ITS-RFLP com base em *primers* descritos por Vrain *et al.* (1992);
- Teste de PCR em tempo real, usando SYBR-green, comercialmente desenvolvido pela Blgg (www. Blgg.nl), baseado na região LSU do rDNA.

Recentemente, ensaios de PCR em tempo real têm sido otimizados para a identificação destas espécies (EPPO, 2013a).

#### **- PCR multiplex (EPPO, 2013a)**

Na reação de PCR multiplex, são amplificados dois ou mais segmentos diferentes de DNA em uma única reação, utilizando-se para isso um conjunto de pares de primers. Assim, esta técnica permite a co-amplificação de mais de um segmento do genoma, o que garante praticamente 100 % de especificidade para a reação, diminuindo os riscos de falso-positivos. Apresenta ainda outras vantagens como rapidez, economia de reagentes e reprodutibilidade na detecção (Lee & Zhang, 2007). Considerando estas vantagens, neste trabalho elegeu-se o teste de PCR *multiplex* como o método de diagnóstico molecular.

O teste PCR multiplex foi desenvolvido por Bulman & Marshall (1997) e utiliza os quistos cheios como fonte de ácido nucleico, podendo apenas ser aplicado para *G. rostochiensis* e *G. pallida*, dada a especificidade dos *primers*. De facto, pode ser observada uma reação cruzada com outros quistos de Heteroderidae (EPPO, 2013a), conduzindo a resultados falso-positivos.

Este teste foi proposto para a região compreendida entre o gene 18S da subunidade SSU do rRNA e a região ITS1 do rDNA (EPPO, 2013a).

Os *primers* que são utilizados neste teste são (Bulman & Marshall, 1997; EPPO, 2013a; Van de Vossenberg *et al.* 2014):

- *Primer* universal ITS5 (5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'),
- *Primer* específico PITSr3 para *G. rostochiensis* (5'-AGCGCAGACATGCCGCAA-3'),
- *Primer* específico PITSp4 para *G. pallida* (5'-ACAACAGCAATCGTCGAG-3').

Os produtos amplificados com estes *primers* resultam num fragmento de 434 bp para a espécie *G. rostochiensis* e num fragmento de 265 bp para a espécie *G. pallida* (EPPO, 2013a).

### **1.6. Medidas de controlo**

Praticamente todas as áreas dentro da região EPPO que cultivam batata já estão infestadas com nemátodes de quisto da batateira, e as espécies *G. rostochiensis* e *G. pallida* encontram-se sujeitas a medidas regulamentares rigorosas quando detetadas isoladamente ou em conjunto (EPPO, 2013a, 2015; DGAV, 2015a).

Em Portugal, o decreto-lei 87/2010, de 16 de julho, transpõe a Diretiva n.º 2007/33/CE, do Conselho, de 11 de junho, e vem criar um novo enquadramento das medidas de proteção fitossanitária destes organismos prejudiciais com o objetivo de proteger as produções nacionais de batata, evitar a sua dispersão no território nacional e europeu. Desta forma, preconiza-se a realização de ações de investigação e de prospeção oficiais com regularidade e eficácia, incluindo a realização de um plano nacional de prospeção.

Os planos de prospeção assentam na inspeção de todos os campos em que as batatas-semente ou plantas enraizadas para comercialização de batata são cultivadas (EPPO, 2013a). Estes campos devem ser considerados isentos de quistos viáveis de ambas as espécies de nemátode de quisto da batateira, ou ficam sujeitos à implementação de medidas fitossanitárias (CABI, 2016a).

Quando há deteção de infestações, os campos são colocados sob quarentena e são preconizadas medidas de controlo dos nemátodes de quisto da batateira que os proprietários têm que ter em conta. As opções passam pelas seguintes

medidas culturais (DGAV, 2015a): i) possibilidade de aderir a um programa oficial que permite o cultivo de batata de consumo de uma cultivar resistente sendo o período de quarentena de 3 anos, ii) pousio durante 6 anos ou iii) cultura com espécies não hospedeiras durante 6 anos.

Os principais hospedeiros das duas espécies de nemátode de quisto da batateira estão limitados às plantas da família Solanaceae, sendo a batata, o tomate e a beringela os principais alvos (Ellenby, 1945). Quando estas plantas são cultivadas em monocultura por várias temporadas em solo infestado, as densidades de nemátodes podem aumentar para níveis muito elevados tornando estas culturas economicamente inviáveis. Para reduzir a densidade populacional dos nemátodes nos campos infestados, opta-se então por fazer rotação com culturas não hospedeiras. No entanto, a taxa de declínio anual dos nemátodes de quisto da batateira no solo é variável, dependendo das culturas não hospedeiras utilizadas, da densidade da população inicial de nemátodes e de vários fatores relacionados com o solo e a população em estudo (Magnusson, 1987).

Se a redução das densidades populacionais de nemátodes de quisto da batateira através da rotação de culturas por si só for muito lenta, podem ser acrescentadas medidas complementares de controlo (CABI, 2016a). Deve-se ter especial precaução em nunca remover solos infestados e adquirir apenas batata-semente certificada. A nível local, deve-se ter em atenção o transporte de solo infestado no calçado, nas patas e dejetos dos animais e nas máquinas agrícolas (Henriques, 2012). Por outro lado, também é importante assegurar a ausência de infestantes hospedeiras nas parcelas infestadas, uma vez que a espécie *G. rostochiensis* pode parasitar também infestantes como doce-amarga (*Solanum dulcamara* L.), meimendro-negro (*Hyoscyamus niger* L.), erva-moira (*Solanum nigrum* L.), oca (*Oxalis tuberosa* L.) e a figueira-do-inferno (*Datura stramonium* L.) (Henriques, 2012).

Outra das medidas adicionais que se pode implementar para controlar a população de nemátodes de quisto da batateira é a técnica da cultura-armadilha. Esta técnica tem como princípio cultivar as batateiras de modo a provocar a eclosão dos juvenis do segundo estágio. Nesta técnica, controla-se o tempo necessário para os nemátodes penetrarem nas raízes e quando se tornam adultos, elimina-se a cultura antes da formação dos novos ovos, suprimindo assim grande parte da próxima geração. Utilizando este método, já foram reduzidas

populações de *G. rostochiensis* em 80 %. No entanto, se a eliminação da cultura é deixada para muito tarde, a densidade de nemátodes pode aumentar. Esta técnica tem um grande potencial para o mercado biológico (CABI, 2016a, 2016b).

A solarização é outra medida a ter em conta, e é um bom método para eliminar nemátodes em climas muito quentes. Nesta técnica, o solo é coberto com duas camadas de polietileno, permitindo que aqueça rapidamente, eliminando os nemátodes que se encontram na camada superficial do solo. No entanto, em climas mais frios e em profundidades superiores a 10 cm não é muito eficaz (CABI, 2016a).

O recurso à alternância de cultivares tolerantes, resistentes e parcialmente resistentes é outra opção para manter um equilíbrio aceitável de patótipos. Segundo Kort *et al.* (1977), existe uma variação considerável nos diferentes patótipos, que é necessário ter em conta no controlo das diferentes populações de *Globodera* spp. (Hockland *et al.*, 2012). Por exemplo, 'Maris Piper' é uma cultivar de batata popular no Reino Unido e tem plena resistência à população do Reino Unido de *G. rostochiensis*, mas nenhuma resistência a *G. pallida* (Davies *et al.*, 2016). O seu cultivo generalizado acabou por privilegiar a espécie *G. pallida* neste país (Varypatakis *et al.*, 2016). Para evitar que esta situação ocorra noutros locais, é necessário recorrer à alternância de cultivares resistentes (CABI, 2016b). Em Portugal existe uma lista de variedades de batatas resistentes a *G. rostochiensis* ou *G. pallida*, publicada pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV, 2015b).

A gestão das populações de *G. pallida* é mais difícil que as de *G. rostochiensis* porque atualmente há menos cultivares de batata comercialmente interessantes resistentes àquela espécie (Skantar *et al.*, 2007), não havendo cultivares de batata com total resistência a *G. pallida* (Marshall, 1998). No entanto, existem cultivares com alta resistência a *G. rostochiensis* e *G. pallida*, por exemplo, as cultivares 'Karaka' e 'Gladiator', respetivamente (Anderson *et al.*, 1993; Genet *et al.*, 1995). Nas variedades de plantas resistentes os juvenis eclodem do quisto, invadem as raízes das plantas, mas são incapazes de criar, com sucesso, um local de alimentação. Em alguns casos, as paredes das células vegetais engrossam e morrem, impedindo o movimento de nutrientes para o juvenil (Rice *et al.*, 1986; Robinson *et al.*, 1988).

Para além das estratégias biológicas já mencionadas anteriormente (a cultura-armadilha e a rotação), têm vindo a ser estudadas outras opções de controlo biológico, mas ainda não existe um produto biológico comercial disponível para controlar os nemátodes de quisto da batateira (Davies, 1998).

Uma das opções que tem vindo a ser estudada é a utilização de resíduos da exploração madeireira e das indústrias madeireiras (tais como casca de coníferas recém-triturada e lignosulfonatos de sódio), que possuem propriedades nematicidas e reduzem significativamente a multiplicação de nemátodes. Foi verificado que a aplicação destes produtos em plantas infestadas diminuiu o número de quistos recém-formados e o número total e a viabilidade dos ovos e dos juvenis dentro dos quistos (Matveeva & Lavrova, 2016).

Por outro lado, as plantas da família Brassicaceae têm vindo a receber muita atenção devido ao seu efeito biofumigante satisfatório causado por uma série de compostos libertados por estas plantas (por exemplo, isotiocianatos, que são tóxicos para muitos nemátodes) (Lennon *et al.*, 2016). Vazquez *et al.* (2016) verificaram que o movimento dos juvenis do segundo estágio é significativamente reduzido pela exposição direta a extratos destas plantas, uma vez que não conseguem detetar a presença dos exsudados radiculares dos hospedeiros. Estes resultados indicam que a decomposição de tecidos de plantas da família Brassicaceae pode prejudicar a mobilidade e a percepção sensorial de juvenis de *G. rostochiensis*, tornando estas culturas interessantes para integrar programas de controlo de *Globodera* sp. em campos de batata (Vazquez *et al.*, 2016). No entanto, ainda não foi alcançada uma aplicação consistente e eficaz da biofumigação para o controle de nemátodes, talvez devido aos curtos períodos de exposição a estes produtos voláteis (Lennon *et al.*, 2016).

A evolução na área de controlo biológico requer uma melhor compreensão da dinâmica das populações dos nemátodes de quisto da batateira (Davies, 1998).

Os tratamentos químicos normalmente não se fazem por serem onerosos, terem fracos resultados e serem altamente perigosos para o ambiente (Henriques, 2012). Muitos dos produtos químicos utilizados anteriormente para o controle de nemátodes já foram proibidos, ou estão em processo de serem eliminados, devido a preocupações ambientais (CABI, 2016b). No entanto, existe uma lista de

produtos nematodocidas com venda autorizada em Portugal. No quadro 7 estão indicados os nematodocidas com venda autorizada pela DGAV (DGAV, 2016).

**Quadro 7** – Nematodocidas com venda autorizada pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV, 2016).

Substância activa	Observações
<b>EMAMECTINA</b> (sal de benzoato)	Nematodocida preventivo
<b>DAZOMETE</b>	Fumigante do solo que atua essencialmente como nematodocida e com ação insecticida e fungicida.
<b>FENAMIFOS</b>	Organofosforado, sistémico, que atua por contacto.
<b>METAME-SÓDIO</b>	Precursor de isotiocianato de metilo, que atua por fumigação. Tem também ação como fungicida.
<b>OXAMIL</b>	Oxima-carbamato, sistémico, que atua por contacto.

### Objetivo do trabalho

O Laboratório de Sanidade Vegetal do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P. (INIAV), em Oeiras, é o laboratório nacional de referência, e a Nematologia tem a seu cargo o processamento das amostras dos programas de prospeção nacional de nemátodes, nomeadamente o dos nemátodes de quisto da batateira, para deteção destes nemátodes nos campos de batata em Portugal.

Tendo em vista dotar o Laboratório de Nematologia do INIAV de uma ferramenta robusta para identificar as espécies *G. rostochiensis* e *G. pallida* através da sua morfologia, com o intuito de diminuir tempos de resposta em análises de rotina e custos adicionais, definiu-se como objectivo deste trabalho avaliar características morfológicas e morfométricas em quistos e nemátodes juvenis do segundo estágio extraídos de amostras de solos para distinção das duas espécies de *Globodera*. Simultaneamente, pretendeu-se validar esses resultados recorrendo a métodos moleculares, para o que se testaram diferentes versões de PCR visando seleccionar os *primers* com maior especificidade para estas espécies, a usar em reacção de PCR multiplex. Adicionalmente, compararam-se dois métodos de extração de quistos para determinar qual o mais eficiente na detecção destes nemátodes nas amostras de solos.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Obtenção de material biológico**

#### **2.1.1. Material de referência**

O material de referência foi fornecido por NVWA - Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority, Wageningen, Holanda. Foram utilizadas neste estudo os seguintes isolados de referência: *Globodera pallida* Pa3 (E400) e *Globodera rostochiensis* Ro 2/3. Este material foi fornecido com um registo de identificação das espécies, realizada através da análise das características morfológicas efetuada pelo Prof. Dr. G. Karssen, em abril de 2016, e comprovadas por PCR em tempo real.

#### **2.1.2. Material biológico português**

O material biológico nacional foi extraído de amostras de solo infestado de 2015 e 2016, cedidas pelo Laboratório de Nematologia do INIAV, em Oeiras. Em caso algum foi sabida a proveniência destas amostras.

Na estufa da quarentena do INIAV (Oeiras) mantiveram-se as populações de *Globodera* detetadas no ano de 2015. Para o efeito, envasaram-se 19 amostras de solo de 2015, cujas análises laboratoriais identificaram como infestadas com *Globodera* spp.. Estas amostras foram divididas em partes iguais e colocadas em vasos com partes de batata grelada, adicionando-se substrato para garantir que a batateira teria suporte para se desenvolver. No total prepararam-se 38 vasos, 2 vasos por cada amostra de solo de 2015. As plantas permaneceram nesta estufa durante 90 dias.

### **2.2. Extração de quistos de *Globodera* spp.**

Passado este período, as batateiras foram cuidadosamente retiradas do solo e as raízes foram observadas à lupa. As amostras de solo ficaram a secar à temperatura ambiente durante uma semana, de modo a que a humidade na amostra fosse reduzida antes do processo de extração.

Foram realizadas extrações em 74 amostras de solo, em que uma fração de 300 g de cada amostra de solo foi alvo de extração de quistos através do método de Fenwick (Anexo I) e outra fração de 300 g das mesmas amostras foi alvo de extração de quistos e de formas móveis através do método de decantação e

crivagem (Anexo II) seguido do método de flutuação centrífuga para as formas móveis (Anexo III). Posteriormente fez-se a contagem dos quistos extraídos por cada método e armazenaram-se em tubos Eppendorf à temperatura ambiente, até à sua utilização para identificação morfológica.

### **2.3. Comparação da eficiência dos métodos de extração de quistos de amostras de solo**

A comparação da eficiência dos dois métodos foi efetuada através de um teste de comparação de médias para amostras emparelhadas, utilizando o *software statistix 9.0®*, uma vez que cada amostra de solo foi analisada em paralelo pelos dois métodos de extração de quistos.

### **2.4. Análise morfológica**

Os quistos esféricos de cor amarela, dourada ou castanha com um pescoço saliente e nenhum cone terminal saliente foram separados dos restantes e identificados como sendo do género *Globodera*, por oposição aos quistos em forma de limão, provavelmente pertencendo ao género *Heterodera*.

Para se analisar a região terminal dos quistos de *Globodera* foram feitos cortes precisos no terço posterior dos quistos, utilizando um bisturi, para assim expor o interior da região terminal. Esta operação foi realizada à lupa com os quistos numa gota de água destilada estéril, sobre uma lâmina. Ao efetuar o corte no quisto, foram também libertados para o exterior ovos e juvenis do segundo estágio (J2).

Nos casos em que se conseguiram cortes possibilitando visualizar o padrão vulvar e se observaram J2 que saíram do quisto e que não se encontravam danificados, colocou-se uma lamela sobre a preparação, para posterior observação e medição ao microscópio. Os quistos em que não foi possível observar o padrão vulvar e/ou pelo menos um J2 para ser caracterizado morfológicamente foram eliminados do estudo.

Foram analisadas 10 características morfológicas e morfométricas em 40 quistos e em 40 juvenis do segundo estágio, correspondentes a cada quisto analisado (de duas amostras de solo de 2015 e de 6 amostras de 2016). Para comparação,



foram medidos e fotografados 4 quistos e J2 de *G. pallida* e 4 quistos e J2 de *G. rostochiensis* das amostras de referência do NVWA, Wageningen.

A identificação morfológica dos nemátodes de quisto da batateira das amostras estudadas foi baseada na combinação das características dos J2 e dos quistos: comprimento do corpo, comprimento do estilete, comprimento da cauda e comprimento da parte hialina da cauda dos J2 e o quociente de Granek (razão entre a distância do ânus até à vulva e o diâmetro da vulva) e o número de pregas do padrão vulvar entre o ânus e a vulva dos quistos. Estas características foram comparadas com as características de referência para estas duas espécies referidas no protocolo PM 7/40 (3) da EPPO (EPPO, 2013a) e com as características publicadas por Fleming & Powers (1998).

As restantes partes dos quistos cortados, contendo ovos e juvenis do segundo estágio, que não se utilizaram na identificação morfológica ficaram armazenadas isoladamente em tubos Eppendorf, com uma gota de água destilada estéril a cerca de 5° C, até à sua utilização para identificação através dos métodos de biologia molecular.

## **2.5. Análise molecular**

### **2.5.1. Validação do método molecular para a deteção de *Globodera pallida* e *Globodera rostochiensis***

Para a validação do método molecular, recorreu-se às amostras de referência do NVWA, Wageningen: Ro 2/3 (amostras de *G. rostochiensis*) e Pa3 (E400) (amostras de *G. pallida*), e testaram-se seis versões diferentes de reações da PCR convencional, descritas para a identificação de quistos e juvenis de *G. rostochiensis* e *G. pallida* (Bulman & Marshall, 1997; Papayiannis *et al.*, 2013; Van de Vossenbergh *et al.*, 2014). As versões diferem umas das outras nas sequências nucleotídicas dos *primers* utilizados (Quadro 8). Este trabalho foi executado no laboratório de Genética Molecular, sob a supervisão da Doutora Filomena Nóbrega.

## • Extração de DNA

O DNA total foi extraído de meio quisto retirado de cada amostra a fim de determinar a robustez e sensibilidade das versões da PCR a testar seguidamente. Os ovos e os juvenis do segundo estágio de cada meio quisto foram transferidos para um tubo Eppendorf com cerca de 10 µl de água estéril. Foram inicialmente macerados com azoto líquido, recorrendo a um micropilão (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Seguidamente, o macerado foi incubado a 56° C durante a noite em solução tampão de lise ATL e 100 µg/ml de proteinase K. Depois da incubação, a extração de DNA total realizou-se com o Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante.

## • Reação em cadeia da polimerase (PCR)

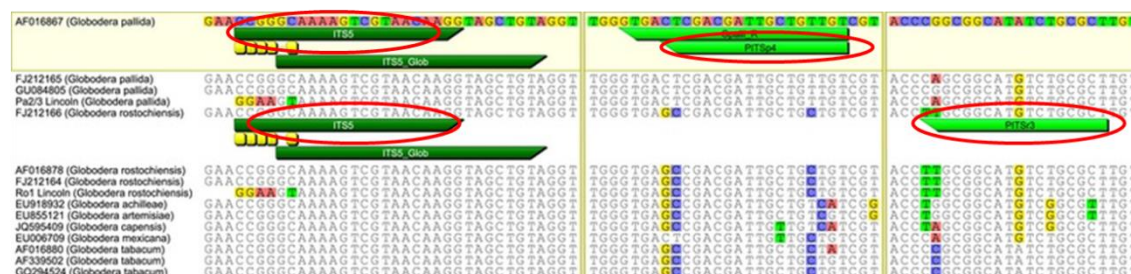
Para distinguir *G. rostochiensis* de *G. pallida*, realizaram-se as reações de PCR convencional, simples e *multiplex*, utilizando os *primers* específicos descritos para as duas espécies (Quadro 8).

**Quadro 8** - *Primers* utilizados nas diferentes versões de reações da PCR para *Globodera rostochiensis* e *Globodera pallida*

<i>Forward Primer</i> (Sequência nucleotídica 5'-3')	<i>Reverse Primer</i> (Sequência nucleotídica 5'-3')	Produto de amplificação
Versão A		
ITS5 (GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G)	PITSr3 (AGC GCA GAC ATG CC GCA A)	434 bp ( <i>G.rostochiensis</i> )
Versão B		
ITS5 (GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G)	PITSp4 (ACA ACA GCA ATC GTC GAG)	265 bp ( <i>G. pallida</i> )
Versão C		
ITS5 (GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G)	PITSp4 (ACA ACA GCA ATC GTC GAG)	265 bp ( <i>G. pallida</i> )
	PITSr3 (AGC GCA GAC ATG CCG CAA)	434 bp ( <i>G.rostochiensis</i> )
Versão D		
ITS5_glob (GCA AAA GTC GTA ACA AGG TAG CTG TA)	G.pall 2 (CCG CTT CCC CAT TGC TTT CG)	261 bp ( <i>G. pallida</i> )
Versão E		
G.rost 1 (GCA AGC CCA GCG TCA GCA AC)	G.rost2 (GAA CAT CAA CCT CCT ATC GG)	315 bp ( <i>G.rostochiensis</i> )
Versão F		
G.pall1 (TGT CCA TTC CTC TCC ACC AG)	G.pall2 (CCG CTT CCC CAT TGC TTT CG)	798 bp ( <i>G. pallida</i> )

Fontes: Versões A, B e C: PM 7/40 (3) (EPPO, 2013a); Versão D: NWWA (standard operating procedure I-MOL-032, Van de Vossenberg *et al.*, 2014) e Versão E e F: Papayiannis *et al.*, 2013

Como já anteriormente referido, estes *primers* são utilizados para amplificar a região ITS1 e estão localizados no gene 18S da subunidade SSU do rRNA e na região ITS1 do rDNA. Os detalhes da localização dos *primers* e a sua especificidade estão apresentados na Figura 20 (Van de Vossenberg *et al.*, 2014)



**Figura 20** – Localização dos *primers* ITS5, PITSp4 e PITSp3 e demonstração da sua especificidade após alinhamento com sequências de *Globodera* spp. (Van de Vossenberg *et al.*, 2014).

Todos os *primers* foram sintetizados pelos laboratórios STAB VIDA (Caparica, Portugal).

As reações de PCR foram realizadas num volume final de 25 µl e para a amplificação foi utilizado o Kit Promega GoTaq Flexi DNA Polimerase (Promega, Madison, USA). A mistura de reação da PCR encontra-se descrita no Quadro 9.

**Quadro 9** - Componentes e respetivos volumes na mistura de reação da PCR

Componente	Volume (µL)	Concentração final
<i>Go taq Flexi Buffer</i> (5x)	5,0	1x
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,0	2,0 mM
dNTPS (20 mM)	0,25	0,2 mM
<i>Primer Forward</i> (10 µM)	1,0	0,04 µM
<i>Primer Reverse G. pallida</i> (10 µM)	1,0	0,04 µM
<i>Primer Reverse G. rostochiensis</i> (10 µM)	1,0	0,04 µM
Água destilada estéril	12,5 (13,5*)	
DNA	2,0	

\*Volume de água destilada estéril quando se adiciona apenas um *primer reverse*

As reações de PCR foram realizadas no termociclador Biometra TGradient (Biometra, Göttingen, Alemanha) com as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 94° C durante 2 min, seguida de 35 ciclos com

desnaturação a 94° C por 30 s, emparelhamento a 55° C durante 30 s e extensão a 72° C por 30 s, e por fim uma extensão final de 7 min a 72° C (EPPO, 2013a).

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio e 0,5x de solução tampão Tris/Borato/EDTA (TBE). Após a corrida eletroforética, os perfis foram visualizados sob luz ultravioleta no analisador de imagens VersaDoc Imaging System (BioRad, EUA).

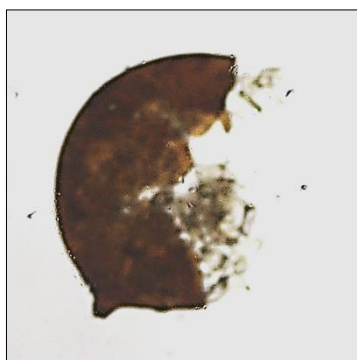
- **Análise molecular das amostras de *Globodera* portuguesas**

Das diferentes versões da PCR testadas, adotou-se para a análise molecular do universo de amostras incluídas neste trabalho a PCR *multiplex* (Versão C do Quadro 8). Prepararam-se os 40 quistos, dividindo-os em duas metades. Cada uma das metades foi primeiramente analisada no que se refere às características morfológicas e as metades correspondentes foram analisadas por PCR *multiplex*, para confirmação dos resultados morfológicos.

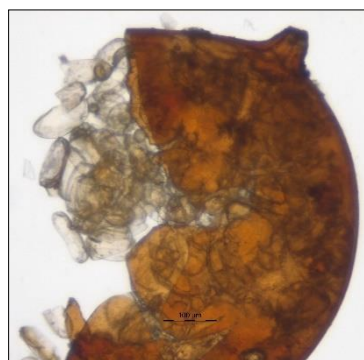
### 3. Apresentação e discussão dos resultados

#### 3.1. Inoculação das batateiras

Das amostras de solo nacional de 2015 envasadas com partes de batata gelada, permanecendo 90 dias na Estufa de Quarentena do INIAV, foram extraídos quistos em 28 dos 38 vasos, que correspondiam a 17 das 19 amostras iniciais. Das 17 amostras em que foram extraídos quistos, apenas sete amostras tinham quistos que foram identificados como sendo de nemátodes do género *Globodera*, sendo os restantes do género *Heterodera*, ficando fora do âmbito deste trabalho. Para o estudo da morfologia das espécies *G. pallida* e *G. rostochiensis* apenas se utilizaram quistos de duas amostras. As restantes cinco amostras continham quistos envelhecidos, deformados, rasgados ou com os ovos aglomerados e amarelados (Figura 21), sendo classificados como deteriorados; ou continham quistos recentes com todos os ovos cheios de J1 ou quistos cujos ovos se encontravam vazios e sem juvenis no seu interior (Figura 22), não podendo ser utilizados neste estudo por não se conseguir fazer a caracterização conjunta de um quisto e de um J2 proveniente do mesmo quisto. Também Rott *et al.* (2010), no seu estudo, se depararam com esta questão de extrações de quistos nulas e de inviabilidade dos quistos, em que afirmaram que apenas extraíram quistos em 21 das 73 amostras que envasaram, e destas 19 continham quistos que classificaram como inviáveis.



**Figura 21** – Quisto deteriorado.



**Figura 22** – Quisto com os ovos vazios.

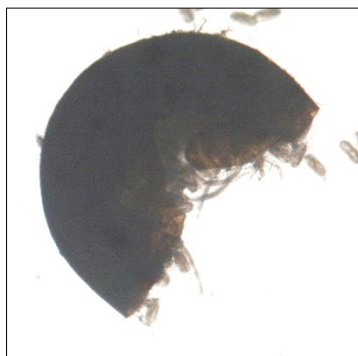
É de salientar que as extrações de quistos, quer através do método de Fenwick, quer do método de decantação e crivagem de Cobb, resultaram em amostras pouco limpas devido ao substrato que se adicionou às amostras de solo na sementeira. De futuro, de modo a não se perder tanto tempo no isolamento dos quistos após a extração através do método de Fenwick, dever-se-á optar por adicionar areia às amostras de solo, resultando em amostras mais limpas após a

extração de quistos. No entanto, se as amostras não ficarem limpas após a extração de quistos, deve-se recorrer ao método de isolamento de quistos através de solventes orgânicos (anexo IV).

Na análise às raízes da batateira não foram observados quistos agarrados aos tecidos da raiz, provavelmente porque caíram quando as batateiras foram retiradas dos vasos. A ligação dos quistos à raiz é muito frágil e é quebrada com muita facilidade (EPPO, 2013a).

A observação das suspensões obtidas através do método de decantação e crivagem seguido do método de flutuação-centrífuga para as formas móveis, também não permitiu detetar nemátodes do género *Globodera*.

Devido ao reduzido número de quistos viáveis (Figura 23) para a identificação morfológica que resultaram da inoculação das batateiras mantidas em estufa, foi necessário recorrer a seis amostras de solo nacional de 2016, que o Laboratório de Nematologia do INIAV foi recebendo durante o decurso deste trabalho. Por este motivo, foram analisados sete quistos do género *Globodera* extraídos de duas amostras de solo nacional de 2015 e trinta e três quistos do género *Globodera* extraídos de seis amostras de solo nacional de 2016.



**Figura 23** – Quisto viável com ovos e juvenis do segundo estágio.

### **3.2. Comparação da eficiência dos métodos de extração de quistos do solo**

No quadro 10 apresenta-se o número de quistos que foram extraídos de amostras de solo através do método de Fenwick e através do método de decantação e crivagem de Cobb.

**Quadro 10 - Contagem de quistos extraídos das amostras de solo em estudo**

Solo	Nº de quistos extraídos pelo método de Fenwick	Nº de quistos extraídos pelo método de Decantação e crivagem	Solo	Nº de quistos extraídos pelo método de Fenwick	Nº de quistos extraídos pelo método de Decantação e crivagem
H1_2015	0	1	GB8AII_2015	0	0
H2_2015	2	5	GB9_2015	0	0
H3_2015	8	2	GB9A_2015	0	1
H4_2015	0	0	GB10_2015	8	4
H5_2015	4	1	GB10A_2015	7	7
H6_2015	2	2	GB11_2015	13	0
H7_2015	0	0	GB11A_2015	28	1
H8_2015	0	0	GB12_2015	0	0
H9_2015	0	0	GB12A_2015	0	0
H10_2015	0	0	GB13_2015	0	0
H11_2015	0	0	GB13A_2015	1	5
H12_2015	0	0	GB14_2015	28	0
H13_2015	0	0	GB14A_2015	0	14
H14_2015	0	0	GB15_2015	16	3
H15_2015	0	0	GB15A_2015	0	1
H16_2015	0	0	GB16_2015	0	0
H17_2015	0	0	GB16A_2015	5	39
H18_2015	0	0	GB17_2015	57	29
H19_2015	0	0	GB17A_2015	76	30
H20_2015	0	0	GB18_2015	93	67
H21_2015	0	0	GB18II_2015	2	0
GB1_2015	2	0	GB18A_2015	1	0
GB1A_2015	1	0	GB19_2015	3	18
GB2_2015	2	1	GB19A_2015	0	3
GB2A_2015	0	0	GB1_2016	60	17
GB3_2015	13	2	GB2_2016	27	0
GB3A_2015	15	3	GB3_2016	204	47
GB4_2015	19	2	GB4_2016	7	0
GB4A_2015	2	2	GB5_2016	1	0
GB5_2015	0	0	GB6_2016	0	0
GB5A_2015	0	0	GB7_2016	0	0
GB6_2015	6	8	GB8_2016	0	0
GB6A_2015	2	2	GB9_2016	0	0
GB7_2015	0	1	GB10_2016	0	0
GB7A_2015	0	0	GB11_2016	0	0
GB8_2015	0	0	GB12_2016	0	0
GB8A_2015	2	1	GB13_2016	0	0

Numa primeira abordagem, procurou-se averiguar se a eficiência dos dois métodos era igual (hipótese nula constituída pela igualdade de médias, hipótese

alternativa pela diferença das médias) com um nível de significância de 0,05, tendo obtido os resultados que constam na Figura 24.

Paired T Test for DecCriv - Fenwick	
Null Hypothesis: difference = 0	
Alternative Hyp: difference <> 0	
Mean	-5.3784
Std Error	2.4645
Mean - H0	-5.3784
Lower 95% CI	-10.290
Upper 95% CI	-0.4667
T	-2.18
DF	73
P	0.0323
Cases Included	74
Missing Cases	0

**Figura 24**– Teste de comparação de médias para amostras emparelhadas para comparação da eficiência dos dois métodos de extração (Fenwick x decantação e crivagem).

Da observação dos resultados apresentados, conclui-se que o desempenho dos dois métodos de extração é significativamente diferente, uma vez que apresenta um valor-p inferior a 0,05, o que permite excluir a hipótese de igualdade dos métodos.

Seguidamente, colocou-se a hipótese do método de Fenwick ser mais eficiente que o método de decantação e crivagem (hipótese nula constituída pela hipótese de o método de Fenwick não ser melhor que o de decantação e crivagem, hipótese alternativa constituída pela hipótese do método de Fenwick ser mais eficiente que o outro).

A análise dos resultados obtidos (Figura 25) permitiu suportar a hipótese, com um nível de significância de 0,05, de que o método de Fenwick é mais eficiente que o de decantação e crivagem (valor-p<0,05), isto é, recupera um maior número de quistos da amostra de solo.

Paired T Test for DecCriv - Fenwick	
Null Hypothesis: difference = 0	
Alternative Hyp: difference < 0	
Mean	-5.3784
Std Error	2.4645
Mean - H0	-5.3784
Lower 95% CI	-10.290
Upper 95% CI	-0.4667
T	-2.18
DF	73
P	0.0161
Cases Included	74
Missing Cases	0

**Figura 25** – Teste de comparação de médias para amostras emparelhadas para averiguar a hipótese do método de Fenwick ser mais eficiente que o método de decantação e crivagem.



### 3.3. Análise morfológica e morfométrica de *Globodera rostochiensis* e *Globodera pallida*

#### 3.3.1. Características morfológicas dos quistos das amostras estudadas

Os quistos de referência identificados como *G. rostochiensis* apresentavam uma cor amarelada ou acastanhada, forma esférica, um pescoço saliente e sem cone terminal; o mesmo aconteceu com os de *G. pallida*. O tamanho dos quistos das duas espécies também era semelhante, não sendo possível diferenciá-los com base nestas duas características, cor e tamanho (Figuras 26 e 27).

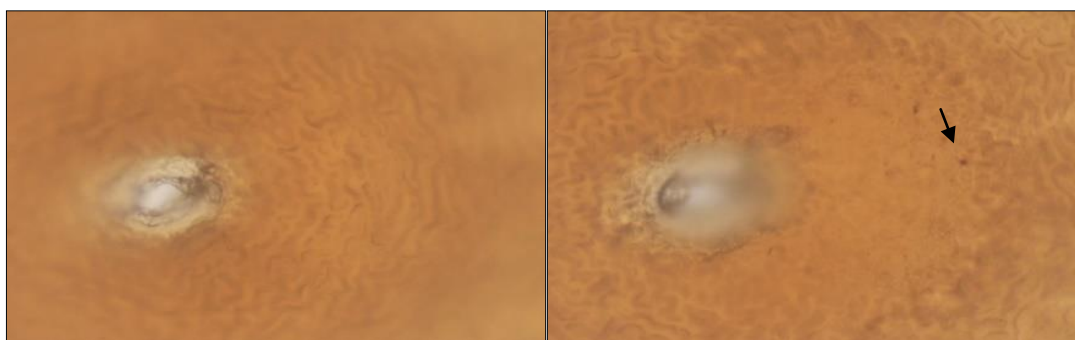


**Figura 26** - Quistos de *Globodera rostochiensis* da amostra Ro 2/3.

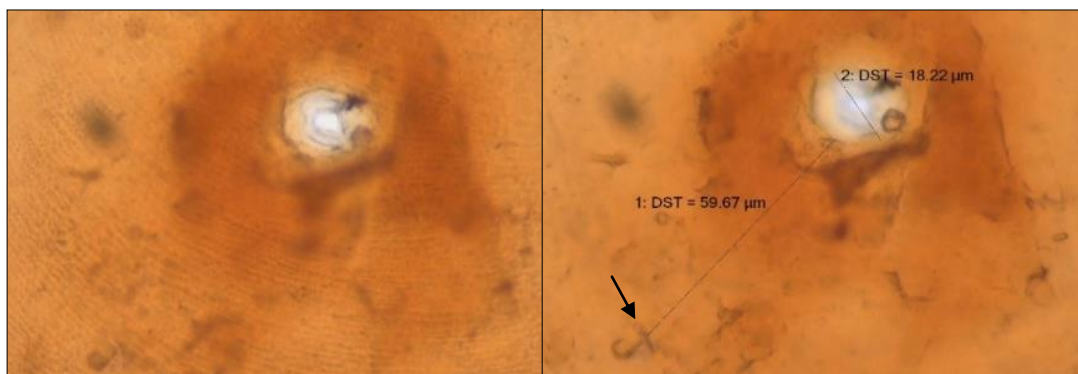


**Figura 27** - Quistos de *Globodera pallida* da amostra Pa3 (E400).

Nos cortes da região terminal das duas espécies foi possível observar a vulva fenestrada e o ânus em forma de V (Figuras 28 e 29). Estas propriedades foram também identificadas por Yu *et al.* (2010), Grose *et al.* (2010) e estão de acordo com outra bibliografia consultada (EPPO, 2013a; Fleming & Powers, 1998).

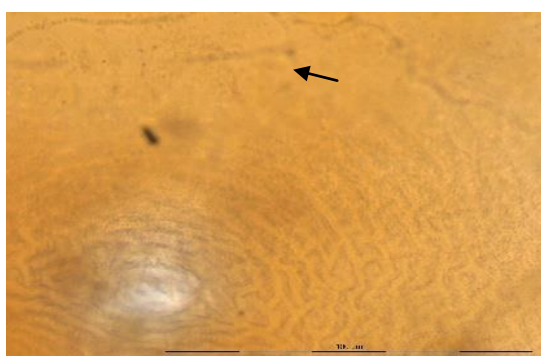


**Figura 28** – Corte da região terminal de um quisto de *Globodera pallida*, em diferentes focagens, onde se observa a vulva fenestrada, o padrão vulvar e o ânus em forma de V (seta).

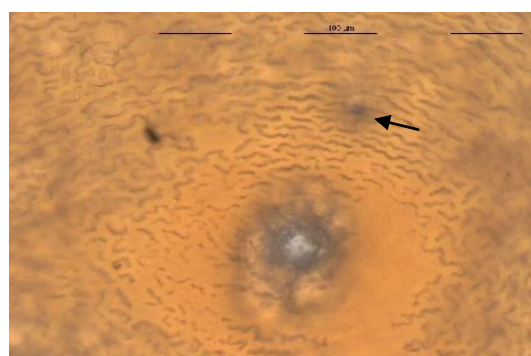


**Figura 29** – Corte da região terminal de um quisto de *Globodera rostochiensis*, em diferentes focagens, onde se observa a vulva fenestrada, o padrão vulvar e o ânus em forma de V (seta).

O padrão vulvar do quisto nem sempre permitiu identificar a espécie a que pertencia o quisto, dificuldade também apontada por Grose *et al.* (2010) (Figuras 30 e 31).



**Figura 30** – Corte da região terminal de quisto de *Globodera pallida*, que não é evidente para diferenciar as espécies de *Globodera*.



**Figura 31** – Corte da região terminal de quisto de *Globodera rostochiensis*, que não é evidente para diferenciar as espécies de *Globodera*.

### 3.3.2. Características morfológicas dos juvenis do segundo estágio das amostras estudadas

Os juvenis do segundo estágio (J2) das duas espécies apresentavam um corpo vermiforme, afunilando nas extremidades, mas mais afunilado na extremidade da cauda (Figuras 32 e 33).



**Figura 32** – Juvenil do segundo estágio de *Globodera pallida*.

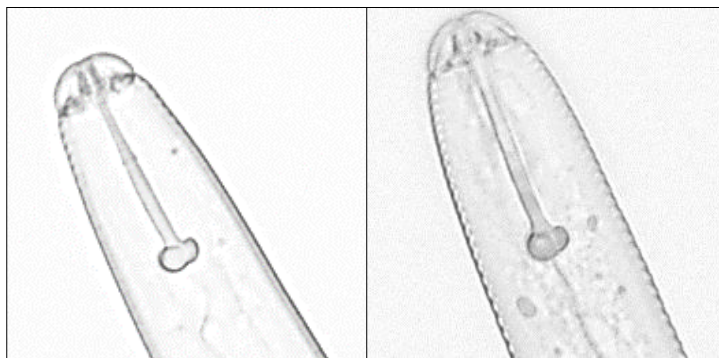


**Figura 33** – Juvenil do segundo estágio de *Globodera rostochiensis*.

Em ambas as espécies a cabeça é compensada e arredondada. O estilete é robusto. Os bolbos basais do estilete são projetados posteriormente na espécie *G. rostochiensis* (Figuras 34 e 35) e projetados anteriormente em *G. pallida* (Figuras 36 e 37). No entanto, em algumas situações, a caracterização do formato dos bolbos basais pode ser ambígua (Figuras 38 e 39).



**Figuras 34 e 35** – Região da cabeça de juvenil do segundo estágio de *Globodera rostochiensis* (x600).



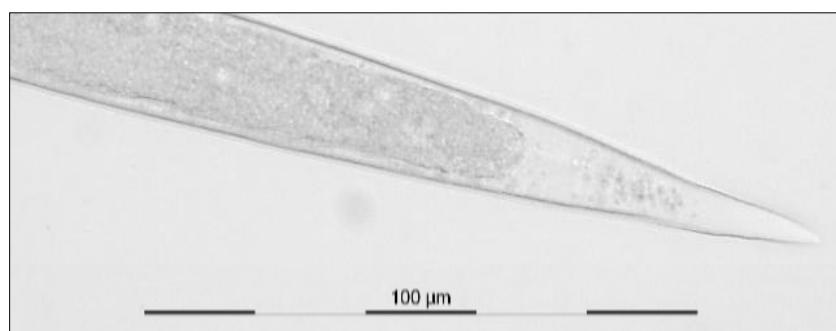
**Figuras 36 e 37** – Região da cabeça de juvenil do segundo estágio de *Globodera pallida* (x600).



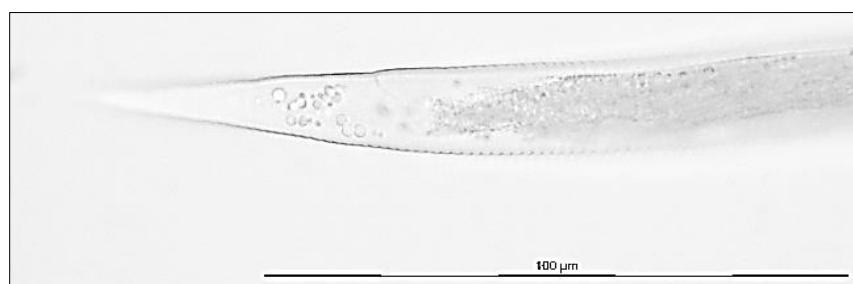
**Figura 38** – Bolbos basais do estilete de juvenil do segundo estágio *Globodera rostochiensis* (x600).

**Figura 39** – Bolbos basais do estilete de juvenil do segundo estágio *Globodera pallida* (x600).

A cauda é reduzida e cônica (Figuras 40 e 41), sendo mais curta na espécie *G. rostochiensis* (Figura 40).



**Figura 40** – Cauda de *Globodera rostochiensis*.



**Figura 41** – Cauda de *Globodera pallida*.

### 3.3.3. Análise das características morfológicas e morfométricas das amostras portuguesas e comparação com amostras de referência

As características morfológicas e morfométricas dos quistos e dos juvenis do segundo estágio analisados neste estudo encontram-se descritas no Quadro 11.

**Quadro 11** – Características morfológicas e morfométricas dos quistos e dos juvenis do segundo estágio de *Globodera rostochiensis* e *Globodera pallida* portuguesas e de referência e respetiva identificação morfológica das espécies de *Globodera*

Nº do quisto	Juvenil do segundo estágio					Quisto					Identificação da espécie
	Comprimento do corpo	Cauda J2	Região Hialina	Bolbos basais	Estilete	Distância vulva/ânus	Diâmetro da vulva	Quociente de Grenek	Padrão Vulvar	nº de pregas	
1	385	(*)	26,42	Proj. anteriormente	28,92	42,64	21,5	1,983	(*)	(*)	<i>G. pallida</i>
2	499,4	29,49	19,51	Proj. posteriormente	20,8	34,69	19,1	1,816	<i>pallida</i>	13	<i>G. pallida</i>
3	394,95	(*)	(*)	Proj. posteriormente	23,69	55,57	14,705	3,779	<i>rostochiensis</i>	> 14	<i>G. rostochiensis</i>
4	477,85	52,66	(*)	Proj. anteriormente	22,06	51,05	25,29	2,019	<i>rostochiensis</i>	> 14	<i>G. rostochiensis</i>
5	481,87	52,06	26,91	Proj. anteriormente	23,86	76,75	22,28	3,445	<i>rostochiensis</i>	> 14	<i>G. pallida</i>
6	534	50,18	28,74	Proj. anteriormente	26,33	39,97	29,31	1,364	<i>pallida</i>	11	<i>G. pallida</i>
7	414,71	(*)	(*)	Proj. anteriormente	21,44	92,57	22,57	4,101	<i>pallida</i>	> 14	<i>G. rostochiensis</i>
8	375,41	42,2	22,98	Proj. anteriormente	24,84	42,4	20,61	2,057	<i>pallida</i>	12	<i>G. pallida</i>
9	406,05	49,3	23,4	Proj. posteriormente	28,68	109,1	36,07	3,025	<i>rostochiensis</i>	> 14	<i>G. rostochiensis</i>
10	399,56	42,36	17,49	Proj. anteriormente	27,39	51,97	23,52	2,210	<i>pallida</i>	14	<i>G. rostochiensis</i>
11	378,98	48,78	19,66	Proj. anteriormente	28,09	59,89	19,21	3,118	<i>pallida</i>	> 14	<i>G. rostochiensis</i>
12	422,17	43,79	28,59	Proj. anteriormente	27,12	51,87	23,75	2,184	<i>pallida</i>	(*)	<i>G. pallida</i>
13	404,14	44,21	22,52	Proj. posteriormente	21,44	152,3	31,83	4,785	<i>rostochiensis</i>	(*)	<i>G. rostochiensis</i>
14	(*)	46,31	28,19	Proj. posteriormente	21,42	93,4	24,12	3,872	<i>rostochiensis</i>	> 14	<i>G. rostochiensis</i>
15	444,92	50,92	27,95	Proj. anteriormente	24,96	58,58	24,75	2,367	<i>pallida</i>	15	<i>G. pallida</i>
16	405,04	50,31	25,71	Proj. anteriormente	25,17	30,63	18,8	1,629	<i>pallida</i>	(*)	<i>G. pallida</i>
17	405,9	48,53	27,76	Proj. anteriormente	22,1	87,63	30,24	2,898	<i>rostochiensis</i>	(*)	<i>G. rostochiensis</i>
18	390,03	(*)	18,61	Proj. posteriormente	21,49	71,09	18,77	3,787	<i>rostochiensis</i>	> 14	<i>G. rostochiensis</i>
19	416,6	50,14	26,31	Proj. anteriormente	25,47	44,44	22,22	2	<i>pallida</i>	10	<i>G. pallida</i>
20	433,69	49,34	26,73	*	25,03	46,71	22,18	2,106	(*)	(*)	<i>G. pallida</i>
21	401,36	50,05	26,34	Proj. anteriormente	23,19	92,7	23,99	3,864	<i>rostochiensis</i>	> 14	<i>G. rostochiensis</i>
22	476,8	51,63	28,61	Proj. anteriormente	24,5	63,66	13,26	4,801	<i>pallida</i>	12	<i>G. pallida</i>

Cont.

23	511,15	51,26	23,67	Proj. anteriormente	26,35	32,9	10,59	3,107	<i>pallida</i>	14	<i>G. pallida</i>
24	436,93	45,98	28,32	Proj. anteriormente	22,16	58,11	17,62	3,298	<i>pallida</i>	17	<i>G. rostochiensis</i>
25	437,88	46,86	19,06	Proj. posteriormente	23,83	61,67	22,41	2,752	<i>rostochiensis</i>	20	<i>G. rostochiensis</i>
26	405,73	46,53	21,53	Proj. anteriormente	24,51	30,05	12,98	2,315	<i>pallida</i>	7	<i>G. pallida</i>
27	487,34	45,3	32,2	Proj. posteriormente	22,84	55,66	16,7	3,333	<i>rostochiensis</i>	> 14	<i>G. rostochiensis</i>
28	458,69	(*)	43,45	Proj. anteriormente	20,73	48,31	23,63	2,044	<i>pallida</i>	12	<i>G. pallida</i>
29	381,85	42,47	22,79	Proj. anteriormente	23,77	45,73	19,37	2,361	<i>pallida</i>	> 14	<i>G. rostochiensis</i>
30	483,04	47,84	29,37	Proj. anteriormente	22,17	21,15	19,56	1,081	<i>pallida</i>	10	<i>G. rostochiensis</i>
31	477,1	49,42	25,59	Proj. anteriormente	22,73	65,25	28,78	2,267	<i>rostochiensis</i>	16	<i>G. rostochiensis</i>
32	393,28	45,63	19,32	Proj. posteriormente	22,02	92,97	26,11	3,561	<i>rostochiensis</i>	>14	<i>G. rostochiensis</i>
33	386,68	34,61	19,15	Proj. posteriormente	21,85	47,23	16,27	2,903	<i>rostochiensis</i>	12	<i>G. rostochiensis</i>
34	425,94	49,56	25,94	Proj. anteriormente	25,58	42	24,47	1,716	<i>pallida</i>	8	<i>G. pallida</i>
35	390,77	41,48	19,89	Proj. anteriormente	24,77	32,01	27,28	1,173	<i>pallida</i>	9	<i>G. pallida</i>
36	375,83	31,67	17,31	Proj. anteriormente	25,26	62,96	18,81	3,347	<i>pallida</i>	16	<i>G. pallida</i>
37	420,94	44,42	21,78	Proj. posteriormente	22,19	66,63	17,88	3,727	<i>rostochiensis</i>	(*)	<i>G. rostochiensis</i>
38	463,33	46,04	31,17	Proj. posteriormente	23,14	52,59	26,87	1,957	<i>rostochiensis</i>	(*)	<i>G. rostochiensis</i>
39	446,88	50,3	23,89	Proj. posteriormente	22,1	54,66	20,96	2,608	<i>rostochiensis</i>	(*)	<i>G. rostochiensis</i>
40	380,22	42,54	22,84	Proj. posteriormente	23,18	36,77	18,95	1,940	<i>rostochiensis</i>	10	<i>G. rostochiensis</i>
AMOSTRAS DE REFERÊNCIA											
P3	(*)	50,68	16,95	Proj. anteriormente	21,2	63,65	20,3	3,135	<i>pallida</i>	14	<i>G. pallida</i>
P4	(*)	76,01	34,27	Proj. anteriormente	25,82	51,97	35,03	1,484	<i>pallida</i>	11	<i>G. pallida</i>
P5	(*)	61,43	27,99	Proj. anteriormente	25,07	52,17	30,43	1,714	(*)	(*)	<i>G. pallida</i>
P6	(*)	48,36	23,61	Proj. anteriormente	25,84	47	21,69	2,167	<i>pallida</i>	9	<i>G. pallida</i>
R4	396,2	65,27	29,14	Proj. posteriormente	23,51	49,56	31,83	1,557	<i>rostochiensis</i>	(*)	<i>G. rostochiensis</i>
R5	(*)	52,52	30,36	Proj. posteriormente	23,44	31,33	21,02	1,4902	<i>rostochiensis</i>	(*)	<i>G. rostochiensis</i>
R11	(*)	48,03	20,32	Proj. posteriormente	22,6	59,67	18,22	3,275	<i>rostochiensis</i>	(*)	<i>G. rostochiensis</i>
R12	441,9	47,22	25,54	Proj. posteriormente	22,16	76,56	33,67	2,274	(*)	(*)	<i>G. rostochiensis</i>
MEDIDAS DE REFERÊNCIA											
FONTE	(*)	(*)	(*)	Proj. posteriormente	21-23 (22)	37-77 (>55)	8-20 (<19)	1.3-9.5 (>3)	<i>rostochiensis</i>	12-31 (>14)	<i>G. rostochiensis</i>
	(*)	(*)	(*)	Proj. anteriormente	21-26 (>23)	22-67 (<50)	18-21 (>19)	1.2-3.5 (<3)	<i>pallida</i>	8-20 (<14)	<i>G. pallida</i>
PM 7_70 (3)	452-486	50-53	26-27	Proj. anteriormente	23-24	48-54	(*)	2.1-2.5	<i>pallida</i>	12	<i>G. pallida</i>
PM 7_70 (3)	392-468	44-51	20-27	Proj. posteriormente	20-22	51-70	(*)	3.0-4.5	<i>rostochiensis</i>	17-20	<i>G. rostochiensis</i>
PM 7_70 (3)	452-468	50-51	26-27	(*)	22-23	51-54	18-20	2.5-3.0	(*)	12-17	

Legenda: (\*): sem dados;  características de *G. pallida*;  características de ambas as espécies;  características de *G. rostochiensis*.

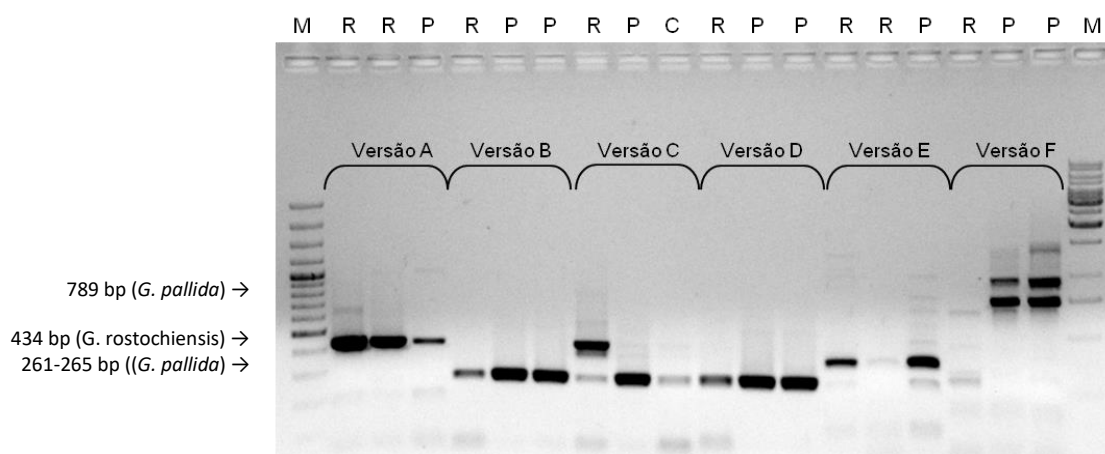


Na interpretação das características das amostras por critérios morfológicos e morfométricos, conclui-se que em 23 amostras (57,5%) foi identificada a espécie *G. rostochiensis* e que nas restantes 17 amostras (42,5%) foi identificada a espécie *G. pallida* (Quadro 11).

A caracterização morfológica pode não ser conclusiva para distinguir as diferentes espécies de *Globodera*, uma vez que os intervalos das características morfológicas se sobrepõem, e as medições efetuadas enquadram-se muitas vezes nos intervalos padronizados das duas espécies.

### 3.4. Análise Molecular

Os produtos amplificados que resultaram da otimização do protocolo para a identificação molecular das espécies *G. pallida* e *G. rostochiensis*, em que foram testadas seis versões de reações PCR, utilizando-se diferentes combinações dos *primers* descritos para estas espécies (Quadro 8), podem ser observados na Figura 42.



**Figura 42** - Gel de agarose 1,5% dos produtos amplificados com as diferentes versões de PCR (Quadro 8). M-marcador de DNA (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific), R-*G.rostochiensis*, P- *G.pallida*, C- controlo de PCR.

Comparando as amplificações das diferentes reações de PCR, observa-se que as versões A, B, C e D conseguiram amplificar as espécies *G. pallida* e *G. rostochiensis*, amplificando os fragmentos com o tamanho molecular esperado: uma banda de 434 bp para as amostras de *G. rostochiensis* e uma banda de cerca de 265 bp para as de *G. pallida*. No entanto, observou-se ainda que, por exemplo, na versão A, a amostra correspondente à espécie *G. pallida* também apresenta uma amplificação, embora de menor intensidade.

O inverso aconteceu nas versões B, C e D, específicas para a espécie *G. pallida*, que amplificaram corretamente uma banda de 265 e 261 bp, respectivamente, nas amostras de *G. pallida*, mas a amostra de *G. rostochiensis* obteve a mesma amplificação, embora com menor intensidade.

Ao se analisar os perfis obtidos para a versão C, observa-se que o controlo de PCR, que não deve apresentar qualquer amplificação, mostra uma banda com intensidade semelhante. Este resultado indica que os *primers* podem formar dímeros e amplificar; conseqüentemente, é necessário ter em conta este resultado na análise global dos perfis obtidos para as amostras.

Como nos controlos de PCR ocorre amplificação, é sempre necessário que no gel de agarose este controlo seja aplicado ao lado das amostras, a fim de permitir uma correta análise das bandas dos produtos de amplificação. Tendo isto em conta, verifica-se que os *primers* específicos para as duas espécies em estudo amplificam corretamente e com o tamanho esperado para os produtos de amplificação.

No caso da versão E, específica para a espécie *G. rostochiensis*, amplificou uma banda de 351 bp na amostra de referência de *G. pallida* e numa das amostras de referência de *G. rostochiensis* e não se verificou nenhuma banda na segunda amostra de referência de *G. rostochiensis*.

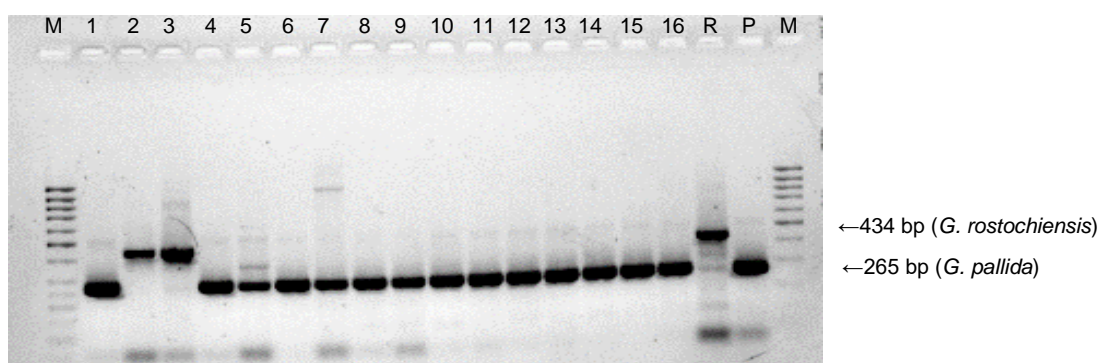
A versão F, específica para a espécie *G. pallida*, não obteve amplificação na amostra de referência de *G. rostochiensis*, mas amplificou duas bandas nas amostras de referência de *G. pallida*, quando era esperada apenas uma banda de 798 bp, específica da *G. pallida*.

Na versão C, versão *multiplex* específica para as espécies *G. pallida* e *G. rostochiensis*, as amostras de referência de *G. pallida* produziram bandas de 265 bp, específicas para *G. pallida*, e as amostras de referência de *G. rostochiensis* produziram bandas de 434 bp, específicas de *G. rostochiensis*. Este resultado está de acordo com o previsto no Protocolo da EPPO PM7/40 (3) (EPPO, 2013a) e também foi o resultado obtido por Van de Vossenberg *et al.* (2014).

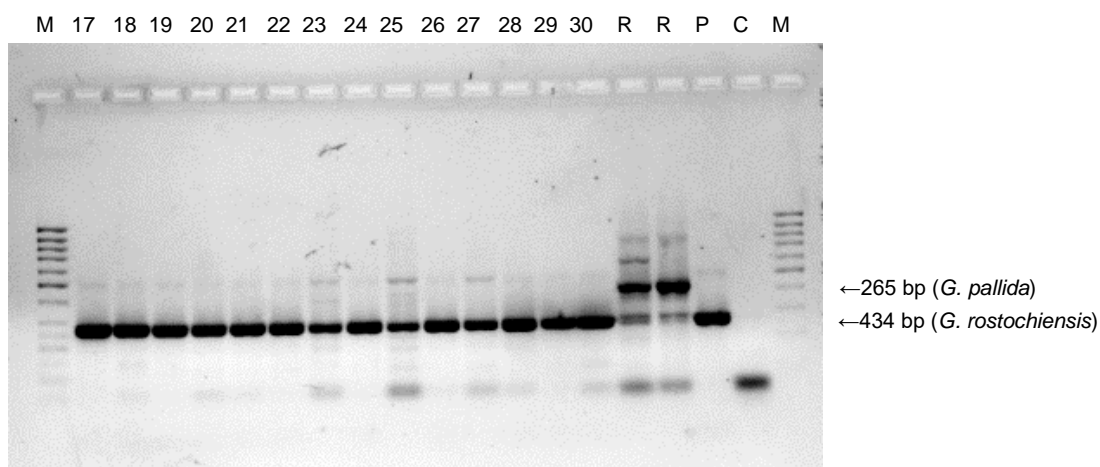


A PCR *multiplex* é uma variação da PCR convencional que utilizando mais do que um par de *primers* na mesma reação, possibilita a amplificação simultânea de mais do que uma sequência de DNA e, conseqüentemente, possibilita a identificação de mais do que uma espécie, promovendo assim uma análise mais rápida e mais económica. A PCR *multiplex* permitiu, em simultâneo, identificar corretamente as duas espécies, ou seja, a versão C, com os *primers* ITS5/PITSp4+PITSr3, provou ser uma versão com especificidade para as espécies *G. pallida* e *G. rostochiensis*. Em conclusão, foi a versão C a selecionada para testar as amostras portuguesas de *G. pallida* e *G. rostochiensis*, tendo sido verificado que a PCR *multiplex* é um teste simples, preciso e económico para um grande número de amostras, requer apenas meio quisto para extração de DNA e pode ser aplicado em análises de rotina.

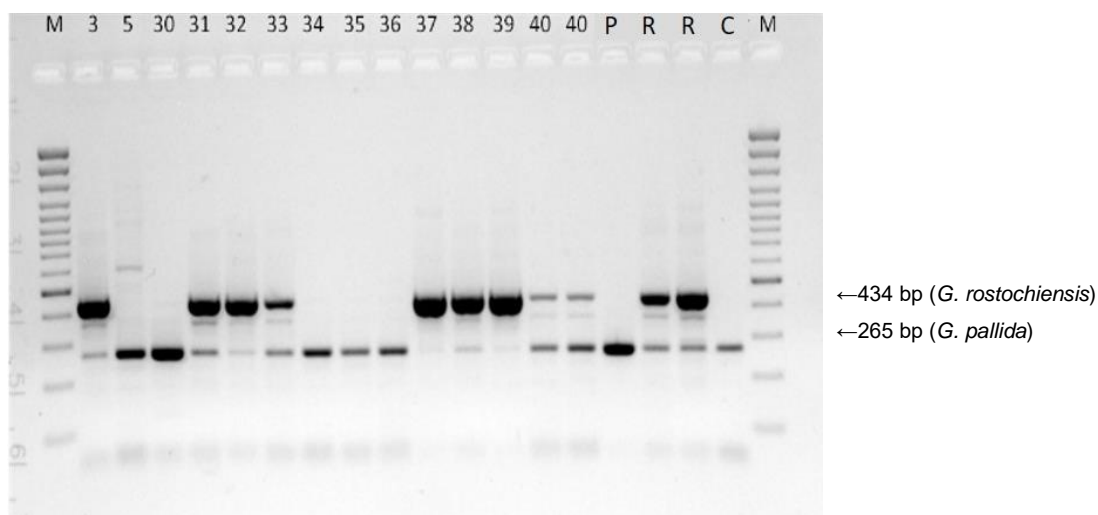
Nas Figuras 43, 44 e 45 apresentam-se os resultados das reações de PCR com os *primers* selecionados (ITS5/PITSp4+PITSr3).



**Figura 43** - Gel de agarose 1,5% dos produtos amplificados com os conjuntos de primers ITS5/PITSp4+PITSr3. M - marcador de DNA (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific), 1 a 16 – Amostras portuguesas de *Globodera* spp. R- *Globodera rostochiensis*, P- *Globodera pallida*.



**Figura 44** - Gel de agarose 1,5% dos produtos amplificados com os conjuntos de primers ITS5/PITSp4+PITSr3. M - marcador de DNA (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific), 17 a 30 – Amostras portuguesas de *Globodera* spp. R- *Globodera rostochiensis*, P- *Globodera pallida*, C- controlo de PCR.



**Figura 45** - Gel de agarose 1,5% dos produtos amplificados com os conjuntos de primers ITS5/PITSp4+PITSr3. M-marcador de DNA (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific), 3, 5, 30 a 40 – Amostras portuguesas de *Globodera* spp. R- *Globodera rostochiensis*, P- *Globodera pallida*, C- controlo de PCR.

Da análise das amplificações, pode-se afirmar que as amostras 2, 3 e a amostra R de referência de *G. rostochiensis* da Figura 43, as amostras R e R de referência de *G. rostochiensis* da Figura 44 e as amostras 3, 31, 32, 33, 37 a 40 e as amostras R e R de referência de *G. rostochiensis* da Figura 45 produziram um produto de PCR de cerca de 434 bp, o específico para a espécie *G. rostochiensis*. Por outro lado, as amostras 1, 4 a 16 e a amostra P de referência de *G. pallida* da Figura 43, as amostras 17 a 30 e a amostra P de referência de *G. pallida* da Figura 44 e as amostras 5, 30, 34, 35, 36 e a amostra P de referência de *G. pallida* da Figura 45 produziram um produto de PCR de cerca de 265 bp, o esperado para a espécie *G. pallida*.

Assim, é possível verificar que nove dos 40 quistos (22,5%) foram identificados como sendo da espécie *G. rostochiensis* (amostras 2, 3, 31, 32, 33, 37, 38, 39 e 40) e que os restantes 31 quistos (77,5%) foram identificados como sendo da espécie *G. pallida*.

### 3.5. Comparação da identificação molecular com a identificação morfológica

Comparando a identificação dos nemátodes nos 40 quistos com base em características morfológicas com a identificação através dos métodos moleculares (Quadro 12), verifica-se que apenas em 27 quistos (67,5 %) essa identificação foi coincidente.

**Quadro 12** - Comparação da identificação das espécies de *Globodera* nas amostras de solo por análise morfológica e morfométrica e por análise molecular

Nº do quisto	Solo	Identificação por PCR <i>multiplex</i>	Análise morfológica e morfométrica
1	Gb1_2016	<i>G. pallida</i>	<i>G. pallida</i>
2	Gb10_2015	<i>G. rostochiensis</i>	<i>G. pallida</i>
3		<i>G. rostochiensis</i>	<i>G. rostochiensis</i>
4	Gb17_2015	<i>G. pallida</i>	<i>G. pallida</i>
5		<i>G. pallida</i>	<i>G. pallida</i>
6		<i>G. pallida</i>	<i>G. pallida</i>
7		<i>G. pallida</i>	<i>G. rostochiensis</i>
8		<i>G. pallida</i>	<i>G. pallida</i>
9	Gb2_2016	<i>G. pallida</i>	<i>rostochiensis</i>
10		<i>G. pallida</i>	<i>G. pallida</i>
11		<i>G. pallida</i>	<i>G. pallida</i>
12		<i>G. pallida</i>	<i>G. pallida</i>
13		<i>G. pallida</i>	<i>G. rostochiensis</i>
14	Gb3_2016	<i>G. pallida</i>	<i>G. rostochiensis</i>
15		<i>G. pallida</i>	<i>G. pallida</i>
16		<i>G. pallida</i>	<i>G. pallida</i>
17		<i>G. pallida</i>	<i>G. rostochiensis</i>
18		<i>G. pallida</i>	<i>G. rostochiensis</i>
19		<i>G. pallida</i>	<i>G. pallida</i>
20		<i>G. pallida</i>	<i>G. pallida</i>
21		<i>G. pallida</i>	<i>G. rostochiensis</i>
22		<i>G. pallida</i>	<i>G. pallida</i>
23		<i>G. pallida</i>	<i>G. pallida</i>
24		<i>G. pallida</i>	<i>G. pallida</i>
25		<i>G. pallida</i>	<i>G. rostochiensis</i>
26		<i>G. pallida</i>	<i>G. pallida</i>
27		<i>G. pallida</i>	<i>G. rostochiensis</i>
28		<i>G. pallida</i>	<i>G. pallida</i>
29		<i>G. pallida</i>	<i>G. rostochiensis</i>
30		<i>G. pallida</i>	<i>G. pallida</i>
31	Gb4_2016	<i>G. rostochiensis</i>	<i>G. pallida</i>
32		<i>G. rostochiensis</i>	<i>G. rostochiensis</i>
33		<i>G. rostochiensis</i>	<i>G. rostochiensis</i>
34	Gb5_2016	<i>G. pallida</i>	<i>G. pallida</i>
35		<i>G. pallida</i>	<i>G. pallida</i>
36		<i>G. pallida</i>	<i>G. pallida</i>
37	Gb6_2016	<i>G. rostochiensis</i>	<i>G. rostochiensis</i>
38		<i>G. rostochiensis</i>	<i>G. rostochiensis</i>
39		<i>G. rostochiensis</i>	<i>G. rostochiensis</i>
40	Gb4_2016	<i>G. rostochiensis</i>	<i>G. rostochiensis</i>

Como fica demonstrado, a caracterização morfológica pode não ser conclusiva para distinguir as diferentes espécies de *Globodera*, como já se tinha referido anteriormente. Por este motivo, a caracterização morfológica tem que ser realizada por técnicos muito experientes, que consigam diferenciar as espécies *G. pallida* e *G. rostochiensis*, e com equipamento ótico de elevada resolução. Esta opinião é, aliás, partilhada por vários investigadores nesta área (Bacic *et al.*, 2013; Seesao *et al.*, 2016; Tirchiet *et al.*, 2016).

A identificação morfológica nem sempre é fiável e, por conseguinte, deve ser validada pelos métodos de identificação molecular complementares (Seesao *et al.*, 2016; Tirchi *et al.*, 2016). No entanto, através da caracterização morfológica é possível identificar sem dúvida nemátodes do género *Globodera*. Esta informação é essencial para a realização do teste PCR *multiplex*, uma vez que segundo Bulman & Marshall (1997) os *primers* referenciados para este teste não são específicos para *Globodera* spp. e pode ser observada uma reação cruzada com quistos de outras espécies da família Heteroderidae. Assim se conclui que a identificação segura de espécies do género *Globodera* tem que complementar a caracterização morfológica com os testes moleculares. Contudo, há laboratórios acreditados para a identificação morfológica das espécies *G. pallida* e *G. rostochiensis*, como é o caso do National Phytosanitary Laboratory – Nematology na Roménia.

Por outro lado, da análise do Quadro 12 é também possível afirmar que nas amostras de solo analisadas não foram observados solos infestados com as duas espécies de *Globodera*. Cinco amostras de solo (Gb17\_2015, Gb1\_2016, Gb2\_2016, Gb3\_2016 e Gb5\_2016) estavam infestadas com *G. pallida* e três com *G. rostochiensis* (Gb10\_2015, Gb4\_2016 e Gb6\_2016). Este resultado contraria o esperado, uma vez que se contava encontrar mais solos infestados com *G. rostochiensis* do que com *G. pallida*, de acordo com os estudos realizados por Conceição *et al.* (2003) e por Cunha *et al.* (2004).

Este facto pode resultar da aplicação das medidas de controlo dos nemátodes de quisto da batateira através da utilização de cultivares resistentes, que pode estar a reduzir as populações de *G. rostochiensis* e a privilegiar a espécie *G. pallida*, uma vez que há menos cultivares de batata comercialmente interessantes resistentes a este nemátode (Skantar *et al.*, 2007).

São necessários estudos mais aprofundados sobre a incidência e a prevalência

destas espécies nos campos de batata portugueses, e uma avaliação dos programas de controlo de *G. pallida* e de *G. rostochiensis* em Portugal.

As características morfológicas e morfométricas dos quistos e dos juvenis do segundo estágio de *G. pallida* e *G. rostochiensis* portuguesas, após validação com testes moleculares encontram-se descritas no Quadro 13.

**Quadro 13** – Características morfológicas e morfométricas dos quistos e juvenis do segundo estágio das espécies *Globodera pallida* e *Globodera rostochiensis* portuguesas, após confirmação com testes moleculares (medidas em  $\mu\text{m}$ , apresentadas em média  $\pm$  desvio padrão e com a amplitude em parêntesis)

	<i>G. pallida</i> (n=31)	<i>G. rostochiensis</i> (n=9)	<i>G. pallida</i> (Ref) (n=4)	<i>G. rostochiensis</i> (Ref) (n=4)	EPPO PM 7/40 (3) (*Fleming & Powers, 1998)
<b>Juvenil do segundo estágio</b>					
Comp. corpo	428,31 $\pm$ 42,76 (375,41-534)	429,20 $\pm$ 43,93 (380,22-499,40)	(...)	419,05 $\pm$ 32,31 (396,2-441,9)	Gp: 452-486 Gr: 392-468
Comp. estilete	24,37 $\pm$ 2,27 (20,73-28,92)	22,41 $\pm$ 0,87 (20,80-23,69)	24,48 $\pm$ 2,22 (21,20-25,84)	23,04 $\pm$ 0,76 (22,16-23,51)	Gp: 23-24 (*21-26 (>23)) Gr: 20-22 (* 21-23 (22))
Comp. cauda	47,10 $\pm$ 4,51 (31,67-52,66)	44,71 $\pm$ 5,21 (34,61-50,30)	52,78 $\pm$ 5,87 (48,36-61,43)	49,87 $\pm$ 2,63 (47,22-52,52)	Gp: 50-53 Gr: 44-51
Comp. parte hialina da cauda	25,39 $\pm$ 5,26 (17,31-43,45)	22,91 $\pm$ 4,07 (19,15-31,17)	24,38 $\pm$ 2,43 (22,85-27,99)	26,21 $\pm$ 4,34 (20,32-29,82)	Gp: 26-27 Gr: 20-27
Formato dos Bolbos basais	25 arrebiteados 6 redondos	1 arrebiteado 8 redondos	4 arrebiteados	4 redondos	Gp: arrebiteados Gr: redondos
<b>Quisto</b>					
Diâmetro da vulva	22,18 $\pm$ 5,40 (10,59-36,07)	21,07 $\pm$ 5,00 (14,71-28,78)	23,94 $\pm$ 4,50 (20,30-30,43)	21,03 $\pm$ 2,23 (18,22-23,67)	Gp: (*18-21 (>19)) Gr: (*8-20 (<19))
Distância da vulva ao ânus	59,67 $\pm$ 27,37 (21,15-152,3)	56,26 $\pm$ 17,60 (34,69-92,97)	53,70 $\pm$ 7,05 (47,00-63,65)	54,28 $\pm$ 18,92 (31,33-76,56)	Gp: 48-54 (*22-67 (<50)) Gr: 51-70 (*37-77 (>55))
Quociente de Grenek	2,77 $\pm$ 1,07 (1,08-5,07)	2,78 $\pm$ 0,75 (1,95-3,77)	2,13 $\pm$ 0,73 (1,48-3,14)	2,15 $\pm$ 0,83 (1,49-3,27)	Gp: 2,1 – 2,5 (*1.2-3.5 (<3)) Gr: 3,0-4,5 (*1.3-9.5 (>3))
Nº de Pregas (vulva – ânus)	12,46 $\pm$ 3,56 (7-20)	12,75 $\pm$ 2,50 (10-16)	11,33 $\pm$ 2,52 (9-14)	>14	Gp: 12 (*8-20 (<14)) Gr: 17-20 (*12-31 (>14))
Padrão Vulvar	20 c/ padrão Gp, 10 c/ padrão Gr, 1 n caracterizado	8 c/ padrão Gr 1 c/ padrão Gp	3 c/ padrão Gp 1 n caracterizado	3 c/ padrão Gr 1 n caracterizado	Gp: Poucas pregas e Dist. vulva-ânus curta Gr: Muitas pregas e Dist. Vulva-ânus grande

Legenda: Gp – *Globodera pallida*, Gr – *Globodera rostochiensis*

Os valores médios das características morfométricas apresentadas pelas amostras nacionais de *G. pallida* e *G. rostochiensis*, na sua generalidade, coincidiram com os valores indicados na literatura publicada (Fleming & Powers, 1998; EPPO, 2013a). No entanto, a amplitude de valores encontra-se fora dos intervalos esperados para estas espécies, o que dificulta a identificação por amostra. O mesmo resultado foi observado nas amostras de referência e em medições realizadas noutros estudos e em diferentes países (Canadá, Estados Unidos da América, Servia e Eslováquia). Nestes estudos também os valores médios estavam de acordo com os valores padrão publicados, mas a amplitude entre os indivíduos ficava fora dos intervalos esperados, uma vez que as amostras estudadas se apresentavam morfologicamente muito variáveis (Yu *et al.*, 2010; Skantar *et al.*, 2011; Bacic *et al.*, 2013; Douda *et al.*, 2014).

#### 4. Conclusão

As espécies de nemátode de quisto da batateira, *Globodera pallida* e *Globodera rostochiensis*, são uma ameaça para a cultura da batata em Portugal. Nesse sentido é necessário distinguir estas espécies visando selecionar as medidas de controlo mais eficazes. Como se tratam de espécies muito semelhantes é necessário recorrer a metodologias laboratoriais robustas, para que se possa fazer um diagnóstico preciso.

Neste trabalho conclui-se que a extração de quistos de amostras de solo é uma etapa muito importante para se detetar a presença de quistos numa área, sendo essencial não se perderem quistos durante o processo de extração. Assim, verificou-se que o método de Fenwick é o método de extração que recupera o maior número de quistos de uma amostra de solo e é o método que deve ser utilizado em análises de rotina.

A identificação morfológica baseada em características dos juvenis do segundo estágio e da zona terminal do quisto tem vindo a ter algum êxito, mas sempre com alguma incerteza, uma vez que os valores destas características morfológicas se sobrepõem em muitos casos. Apenas técnicos muito especializados na identificação morfológica e munidos de equipamento ótico de elevada resolução conseguem ultrapassar esta dificuldade, sendo necessário complementar a identificação morfológica com a identificação através de métodos moleculares.

Neste trabalho verificou-se que a PCR *multiplex*, com os *primers* ITS5/PITSp4+PITSr3, tem sucesso na correta identificação das espécies *G. rostochiensis* e *G. pallida*, bastando apenas meio quisto como fonte de DNA. Trata-se de um teste simples, preciso e económico, que pode ser aplicado em análises rotineiras.

Apesar do desenvolvimento de métodos de identificação moleculares, o uso da abordagem morfológica permanece útil em combinação com estes métodos. O teste PCR *multiplex* para ser bem-sucedido necessita que a caracterização morfológica identifique antecipadamente o quisto como sendo do género *Globodera*, uma vez que os *primers* referenciados para este teste não são específicos para *Globodera* spp. (Bulman & Marshall, 1997).

A análise dos solos provenientes de campos portugueses permitiu identificar um maior número de amostras com *G. pallida*, o que contraria a ideia de que a

espécie *G. rostochiensis* seria a mais disseminada em Portugal. Este facto leva a questionar se as medidas de controlo estão a ser eficazes ou se se estará a eliminar a espécie *G. rostochiensis* e a privilegiar a espécie *G. pallida*, como está a suceder no Reino Unido. São necessários estudos futuros para avaliar a incidência e a prevalência da espécie *G. pallida* em Portugal, e para avaliar a eficácia das medidas fitossanitárias aplicadas.

Nesse sentido, o Plano Nacional de Prospeção dos nemátodes de quisto da batateira levado a cabo pela DGAV deve abranger a maior área possível de produção de batata, com particular atenção aos campos de batata-semente para cumprimento da isenção de ambas as espécies. Se possível ainda, a amostragem no território nacional deverá ser intensificada visando confirmar a tendência de dispersão de *G. pallida*. Para esse efeito, o Laboratório de Nematologia do INIAV detém o *know-how* necessário para a caracterização morfológica que, conjugada com a análise molecular, possibilita o diagnóstico preciso dos nemátodes de quisto da batateira.



## 5. Referências bibliográficas

- Anderson, J., Lewthwaite, S., Genet, R., Broam, F. & Gallagher, D. (1993). "Karka": A new fresh market potato with high resistance to *Globodera pallida* and *Globodera rostochiensis*. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 21: 95-97.
- Bacic, J., Geric Stare, B., Širca, S. & Urek, G. (2013). Morphometric and molecular analysis of potato cyst nematodes from Serbia. Slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo Bled. Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije. Zbornik predavanj in referatov, 11:369-372.
- Berger, P. (2007). Potato cyst nematode. NPDN National Meeting. Orlando. Disponível em: [http://www.kirkenr.com/PCN/USDA\\_Berger\\_Presentation.pdf](http://www.kirkenr.com/PCN/USDA_Berger_Presentation.pdf).
- Brodie, B. (1976). Effects of birds ingesting *Heterodera rostochiensis* cysts on viability of eggs and larvae. Journal of Nematology, 8(4):318-322.
- Bulman, S. & Marshall, J. (1997). Differentiation of australasian potato cyst nematode (PCN) populations using the polymerase chain reaction (PCR). New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 25:123–129.
- CABI. (2016a). Invasive species compendium: Data sheets on *Globodera rostochiensis* (yellow potato cyst nematode). Centre for Agricultural Bioscience International (CABI). Disponível em: <http://www.cabi.org/isc/datasheet/27034>.
- CABI. (2016b). Invasive species compendium: Data sheets on *Globodera pallida* (white potato cyst nematode). Centre for Agricultural Bioscience International (CABI). Disponível em: <http://www.cabi.org/isc/datasheet/27033>.
- Cobb, N. (1918). Estimating the nema population of the soil. Agric. Tech. Circ. U.S. Dept. Agric, 1-48.
- Conceição, I., Santos, M., Abrantes, I. & Santos, S. (2003). Using RAPD markers to analyse genetic diversity in portuguese potato cyst nematode populations. Nematology, 5(1):137-143.
- Coyne, D., Nicol, J. & Claudious-Cole, B. (2007). Practical plant nematology: a field and laboratory guide. SP-IPM Secretariat, International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Benin.
- Cunha, M., Conceição, I., Abrantes, I., Evans, K. & Santos, S. (2004). Characterisation of potato cyst nematode populations from Portugal. Nematology, 6(1):55-58.
- Davies, K. (1998). Natural parasites and biological control. In: S. Sharma (Eds.) The cyst nematodes. London, UK: Chapman and Hall.

- Davies, K., Pickup, J., Cole, Y. & Andreson, E. (2016). The use of resistant varieties and nematicides to manage *Globodera pallida* populations in field trials Scotland. In: 32<sup>nd</sup> Symposium Abstract Book. (pp. 96). Braga: European Society of Nematologists.
- Decreto-lei n.º 87/2010 de 16 de julho do Ministério da Agricultura, Controlo dos nemátodos de quisto da batateira. Diário da República: I série, n.º 137 (2010). Disponível em [www.dre.pt](http://www.dre.pt).
- DGAV. (2015a). Organismos de quarentena. Acções realizadas. Relatórios de 2014. (pp. 41-48). Lisboa, Portugal: Direção Geral de Alimentação e Veterinária. Direção de Serviços de Sanidade Vegetal.
- DGAV. (2015b). Lista de variedades de batata resistentes a *Globodera rostochiensis* ou *G. pallida*. Lisboa, Portugal: Direção Geral de Alimentação e Veterinária. Direção de Serviços de Sanidade Vegetal.
- DGAV. (2016). Lista de produtos com venda autorizada – nematodocidas. Disponível em: [http://www.dgav.pt/fitofarmacuticos/lista/Introd\\_lista/nematodocidas\\_lista.htm](http://www.dgav.pt/fitofarmacuticos/lista/Introd_lista/nematodocidas_lista.htm)
- Diretiva 2009/7/CE da Comissão, de 10 de Fevereiro, que altera os anexos I, II, IV e V da Diretiva 2000/29/CE do Conselho relativa às medidas de proteção contra a introdução na Comunidade de organismos prejudiciais aos vegetais e produtos vegetais e contra a sua propagação no interior da Comunidade. Jornal Oficial da União Europeia, L 40/12, 2009.
- Diretiva 2007/33/CE do Conselho, de 11 de Junho, relativa ao controlo dos nemátodos de quisto da batateira e que revoga a Diretiva 69/465/CEE. Jornal Oficial da União Europeia, L 156/12, 2007.
- Diretiva 2000/29/CE do Conselho, de 8 de Maio de 2000, relativa às medidas de proteção contra a introdução na Comunidade de organismos prejudiciais aos vegetais e produtos vegetais e contra a sua propagação no interior da Comunidade. Jornal Oficial da União Europeia, L 169, 2000.
- Douda, O., Zouhar, M., Renco, M. & Marek, M. (2014). Molecular and morphological exploration of a mixed population of two potato-parasiting nematode species, *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. Helminthologia, 51(1):3–6.
- Eisenback, J. & Rammah, A. (1987). Evaluation of the utility of a stylet extraction technique for understanding morphological diversity of several genera of plant-parasitic nematodes. Journal of Nematology, 19(3):384-386.

- Ellenby, C. (1945). Susceptibility of south american tuber-forming species of *Solanum* to the potato-root eelworm *Heterodera rostochiensis* Wollenweber. *Empire Journal of Experimental Agriculture*, 13:158-168.
- EPPO. (2013a). *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* PM 7/40 (3). European and Mediterranean Plant Protection Organization. EPPO Bulletin, 39:354-368.
- EPPO. (2013b). Nematode extraction PM 7/119 (1). European and Mediterranean Plant Protection Organization. EPPO Bulletin, 43(3):471–495.
- EPPO. (2015). EPPO A1 and A2 lists of pests recommended for regulations as quarantine pests. PM 1/2 (24). European and Mediterranean Plant Protection Organization. EPPO Standards.
- Fenwick, D. (1940). Methods for the recovery and counting of cysts of *Heterodera schachffii* from soil. *Journal Helminthology*, 18:155-172.
- Fleming, C. & Marks, R. (1982). A method for quantitative estimation of *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* in mixed species samples. *Record of Agricultural Research of the Department of Agriculture for Northern Ireland*, 30: 67–70.
- Fleming, C. & Powers, T. (1998). Potato cyst nematode diagnostics: morphology, differential hosts and biochemical tecnics. In: B. Marks & B. Brodie (Eds.) *Potato Cyst Nematodes: Biology, Distribution and Control*. (pp. 27-43). Wallingford: CAB International.
- Fleming, C., Rao, J., Moreland, B., Craig, D. & Turner, S. (2000). Diagnostics of cyst nematodes and tephritid fruit flies using mitochondrial and ribosomal DNA. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 30:585–590.
- Franco, J. (1979). Effect of temperature on hatching and multiplication of potato cyst-nematodes. *Nematologica*, 25(2):237-244.
- Genet, R., Braam, W., Gallagher, D., Anderson, J. & Lewthwaite, S. (1995). 'Gladiator': a new potato cultivar with high resistance to potato cyst nematode and powdery scab suitable for french fries and fresh market. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 23(1):105-107.
- Globalagrimar. (2015). Ficha de internacionalização: Batata. Gabinete de planeamento, políticas e administração Geral (GPP). Disponível em: <http://213.30.17.29/GlobalAgriMar/informacao>.
- Green, C. & Miller, L. (1969). Cyst nematodes: attraction of males to females. Report of Rothamsted Experimental Station for 1968. Part 1. (pp. 153-158). Rothamsted, UK: Rothamsted Experimental Station.

- Green, C. & Plumb, S. (1970). The interrelationships of some *Heterodera* species indicated by the specificity of the male attractants emitted by their females. *Nematologica*, 16:39-46.
- Grenier, E., Fournet, S., Petit E. & Anthoine, G. (2010). A cyst nematode 'species factory' called the Andes. *Nematology*, 12(2):163-169.
- Grose, M., Calin, M., Coman, C., Costache, C. & Aurelian, N. (2010). Metode de depistare si identificare a nematozilor cu chiști *Globodera rostochiensis* și *Globodera pallida* utilizate în Laboratorul Central Fitosanitar. Sesiunea Anuală de Comunicări Științifice-Brașov.
- Handoo, Z., Carta, L., Skantar, A. & Chitwood, D. (2012). Description of *Globodera ellingtonae* n. sp (Nematoda: Heteroderidae) from Oregon. *Journal of Nematology*, 44:40–57.
- Heitor, J. (2006). Como se produz o nemátodo dourado da batateira. Ficha técnica 1. Porto, Portugal: Direcção Regional de Agricultura de Entre-Douro e Minho, Divisão da Protecção das Culturas.
- Henriques, L. (2012). Nemátodos de quisto da batateira – *Globodera rostochiensis* e *G. pallida*, Boletim Técnico BT/12. Instituto Nacional de Investigação Agrária. Unidade de Investigação de Protecção de Plantas.
- Hockland, S., Niere, B., Grenier, E., Blok, V., Phillips, M., Nijs L., Anthoine, G., Pickup, J. & Viaene, N. (2012). An evaluation of the implications of virulence in non-European populations of *Globodera pallida* and *G. rostochiensis* for potato cultivation in Europe. *Nematology*, 14(1):1-13.
- INE. (2013). Estatísticas agrícolas 2013. Instituto Nacional de Estatística. Disponível em: [http://www.gpp.pt/images/Agricultura/Estatisticas\\_e\\_Analises/PAC\\_UE\\_Estatisticas/EA\\_2013b.pdf](http://www.gpp.pt/images/Agricultura/Estatisticas_e_Analises/PAC_UE_Estatisticas/EA_2013b.pdf)
- INE. (2014). Estatísticas agrícolas 2014. Instituto Nacional de Estatística. Disponível em: <http://www.peprobe.com/pt-pt/document/agricultural-statistics-2014-ine>.
- INE. (2016a). Produção das principais culturas agrícolas (t) por Localização geográfica (NUTS - 2013) e Espécie. Instituto Nacional de Estatística. Disponível em: [https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_indicadores&indOcorrCod=0000020&contexto=bd&selTab=tab2](https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000020&contexto=bd&selTab=tab2).
- INE. (2016b). Superfície das principais culturas agrícolas (ha) por Localização geográfica (NUTS - 2013) e Espécie. Instituto Nacional de Estatística.

[https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_indicadores&indOcorrCod=0000018&contexto=bd&selTab=tab2](https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000018&contexto=bd&selTab=tab2).

- Jones, F. & Parrot, D. (1969). Population fluctuations of *Heterodera rostochiensis* Woll. when susceptible potato varieties are grown continuously. *Annals of Applied Biology*, 63:175-181.
- Kort, J., Ross, H., Rumpenhorst, H. & Stone, A. (1977). An international scheme for identifying and classifying pathotypes of potato cyst-nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Nematologica*, 23(3):333-339.
- Lax, P., Rondan, Dueñas, C., Franco-Ponce, J., Gardenai, C. & Doucet, M. (2014). Morphology and DNA sequence data reveal the presence of *Globodera ellingtonae* in the andean region. *Contributions to Zoology*, 83:227–243.
- Lee, I. & Zhang, B. (2007). Multiplex PCR assay design by hybrid multiobjective evolutionary algorithm. (pp. 376-38). Korea: Computer Science.
- Lennon, J., Jones, L., Lilley, C. & Urwin, P. (2016). Xenobiotic metabolism of *Globodera pallida* in context of biofumigation, In: 32<sup>nd</sup> Symposium Abstract Book. (pp. 108). Braga: European Society of Nematologists.
- Macara, A. (1963). Aspectos sobre a importância dos nemátodos de interesse agrícola em Portugal e no Ultramar Português. *Agros*, 46: 367-384.
- Magnusson, M. (1987). Effects of some non-host crops on population density of *Globodera rostochiensis*. *VSxtskyddsnötiser*, 12:17-25.
- Marks, B. & Brodie, B. (1998). Potato Cyst Nematodes: Biology, Distribution and Control. (pp. 75-139). Wallingford, UK: CAB International.
- Marshall, J. (1998). Potato cyst nematodes (*Globodera*) species New Zealand and Australia. In: B. Marks & B. Brodie (Eds.) *Potato Cyst Nematodes: Biology, Distribution and Control*. (pp. 359-394). Wallingford: CAB International.
- Matveeva, E. & Lavrova, V. (2016). Dispersal of potato cyst-forming nematode in the North-West of Russian Federation. Pre- and In-field practices of *Globodera* management. In: 32<sup>nd</sup> Symposium Abstract Book. (pp. 97). Braga: European Society of Nematologists.
- Melo, L. (1995). Um modelo para identificação de nematóides através da estrutura do estilete. Trabalho individual submetido ao curso de Pós-Graduação em Ciências da Computação, Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina.

- Mota, M. (1989a). Caracterização morfológica e identificação dos nemátodes-dos-quistos, *Heterodera* spp. e *Globodera* spp. Trabalho de síntese destinado às provas de aptidão pedagógica. (pp. 3-49). Évora: Universidade de Évora.
- Mota, M. (1989b). Extração de nemátodes do solo e de tecidos vegetais. Relatório para uma aula prática, destinado às provas de aptidão pedagógica e capacidade científica. (pp. 22-23). Évora: Universidade de Évora.
- Mota, M. & Eisenback, J. (1993a). Morphology of second-stage juveniles and males of *Globodera tabacum tabacum*, *G. t. virginiae*, and *G. t. solanacearum* (Nemata: Heteroderinae). *Journal of Nematology*, 25(1):27-33.
- Mota, M. & Eisenback, J. (1993b). Morphology of females and cysts of *Globodera tabacum tabacum*, *G. t. virginiae*, and *G. t. solanacearum* (Nemata: Heteroderinae). *Journal of Nematology*, 25(2):136-147.
- Mugniery, D. (1979). Hybridization between *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) and *G. pallida* (Stone). *Revue de Nematologie*, 2(2):153-159.
- Mugniery, D., Bossis, M. & Pierre, J. (1992). Hybridization between *Globodera rostochiensis* (Wollenweber), *G. pallida* (Stone), *G. virginiae* (Miller & Gray), *G. solanacearum* (Miller & Gray) and *Globodera* "mexicana" (Campos-Vela). Description and future of the hybrids. *Fundamental and Applied Nematology*, 15(4):375-382.
- Oostenbrink, M. (1950). Het aardappelaaltje (*H. rostochiensis* Wollenweber) een gevarlijke parasiet voor de eenzijdige aardappelcultuur. Versl. PI Ziekt. Diensf. Wageningen, 115: 230.
- Paap, C. (2013). *Globodera rostochiensis*. Life cycle. Disponível em: <http://plpnemweb.ucdavis.edu/nemaplex/Taxadata/G053S2.HTM#Life Cycle>:
- Papayiannis, L., Christoforou, M., Markou, Y. & Tsaltas, D. (2013). Molecular typing of cyst-forming nematodes *Globodera pallida* and *G. rostochiensis*, using Real-Time PCR and evaluation of five methods for template preparation. *Journal of Phytopathology*, 161(7-8):459-469.
- Perry, R. (1998). The physiology and sensory perception of cyst nematodes, *Globodera* species. In: B. Marks & B. Brodie (Eds.), *Potato Cyst Nematodes: Biology, Distribution and Control*. (pp. 27-43). Wallingford: CAB International.
- Perry, R. & Beane, J. (1988). Effects of activated charcoal on hatching and infectivity of *Globodera rostochiensis* in pot tests. *Revue de Nématologie*, 11:229-233.

- Rice, S., Leadbeater, B. & Stone, A. (1986). Changes in roots of resistant potatoes parasitized by potato cyst-nematodes. I. Potatoes with resistance gene H1 derived from *Solanum tuberosum* ssp. andigena. *Physiology and Plant Pathology*, 27:219-234.
- Robinson, M., Atkinson, H. & Perry, R. (1988). The association and partial characterization of a fluorescent hypersensitive response of potato roots to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Revue de Nématologie*, 11:99-108.
- Rott, M., Lawrence, T., Belton, M., Sum, F. & Kyle, D. (2010). Occurrence and detection of *Globodera rostochiensis* on Vancouver Island, British Columbia: An update. *Plant Dis*, 94:1367-1371.
- Santos, S. & Fernandes, M. (1988). The occurrence of *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* in Portugal. *Nematologia Mediterranea*, 16:145.
- Seesao, Y., Gaya, M., Merlinc, S., Viscogliosib, E., Aliouat-Denisb, C. & Audebet, C. (2016). A review of methods for nematode identification, *Journal of Microbiological Methods*, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2016.05.030>.
- Shepherd, A. & Clarke, A. (1971). Moulting and hatching stimuli. In: M. Zuckerman, F. Mai & R. Rhode (Eds.), *Plant Parasitic Nematodes*. Volume II. (pp. 267-287). New York, USA and London, UK: Academic Press.
- Skantar, A., Handoo, Z., Carta, L. & Chitwood, D. (2007). Morphological and molecular identification of *Globodera pallida* associated with potato in Idaho. *Journal of Nematology*. 39(2):133–144.
- Skantar, A., Handoo, Z., Zasada, I., Inghram, R., Carta, L. & Chitwood, D. (2011). Morphological and molecular characterization of *Globodera* populations from Oregon and Idaho. *Phytopathology*, 101:480-491.
- Stone, A. (1973). *Heterodera pallida* n.sp. (Nematoda: Heteroderidae), a second species of potato cyst nematode. *Nematologica*, 18:591-606.
- Thiéry, M. & Mugniéry, D. (1996). Interspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in *Globodera* species, parasites of solanaceous plants. *Fundamental and Applied Nematology*, 19:471–479.
- Tirchi, N., Troccoli, A., Fanelli, E., Mokabli, A., Mouhouche, F. & De Luca, F. (2016). Morphological and molecular identification of potato and cereal cyst nematode isolates from Algeria and their phylogenetic relationships with other populations from distant their geographical areas. *European Journal of Plant Pathology*, doi:10.1007/s10658-016-0965-z

- Van Bezooijen, J. (2006). Methods and techniques for nematology, Wageningen. Disponível em: [https://www.wur.nl/upload\\_mm/4/e/3/f9618ac5-ac20-41e6-9cf1-c556b15b9fa7\\_MethodsandTechniquesforNematology.pdf](https://www.wur.nl/upload_mm/4/e/3/f9618ac5-ac20-41e6-9cf1-c556b15b9fa7_MethodsandTechniquesforNematology.pdf).
- Van De Vossenbergh, B., Voogd, J., Westenberg, M. & Karssen, G. (2014). Comparison of three conventional PCR test (Bulman & Marshall, 1997) versions for the molecular identification of *Globodera pallida* and *G. rostochiensis* cysts and juveniles. EPPO Bulletin, 44:27-33.
- Van Riel, H. & Mulder, A. (1998). Potato cyst nematodes (*Globodera* species) in western Europe. In: B. Marks & B. Brodie (Eds.), Potato Cyst Nematodes: Biology, Distribution and Control. (pp. 317–332). Wallingford: CAB International.
- Varypatakis, K., Blok, V., Cock, P. & Jones, J. (2016). Identification of avirulence genes in *Globodera pallida* as tools for assessing durability of resistance. In: 32<sup>nd</sup> Symposium Abstract Book. (pp. 365). Braga: European Society of Nematologists.
- Vazquez, Y., Viaene, N. & Moens, M. (2016). Brassicaceous cover crops interfere with mobility and host finding ability of *Globodera rostochiensis* juveniles. In: 32<sup>nd</sup> Symposium Abstract Book. (pp. 241). Braga: European Society of Nematologists.
- Vrain, T., Wakarchuk, D., Levesque, A. & Hamilton, R. (1992). Interspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. Fundamental and Applied Nematology, 16: 563–573.
- White, T., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M. Innis, A. Gelfand, J. Sninsky & T. White (Eds.), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. (pp. 315-322). New York: Academic Press, Inc.
- Wollenweber, H. (1923). Krankheiten und Beschädigungen der Kartoffel. Arb. Forsch. Inst. Kartof. Berlin, 7: 1-56.
- Yu, Q., Ye, W., Sum, F. & Miller, S. (2010). Characterization of *Globodera rostochiensis* (Tylenchida: Heteroderidae) associated with potato in Quebec, Canada. Canadian Journal of Plant Pathology, 32(2): 264–271.
- Zasada, I., Ingham, R. & Phillips, W. (2015). Biological insights into *Globodera ellingtonae*. 4th Symposium of Potato Cyst Nematode Management. Aspects of Applied Biology 130.
- Zasada, I., Peetz, A., Wade, N., Navarre, R. & Ingham, R. (2013). Host status of different potato (*Solanum tuberosum*) varieties and hatching in root diffusates of *Globodera ellingtonae*. Journal of Nematology, 45:195–201.



## **6. Anexos**

### **Anexo I – Extração de nemátodes de quisto através do método de Fenwick**

**Materiais:** Levigador de Fenwick; crivo de 350 µm para reter partículas grosseiras, crivo de 250 µm para reter os quistos; esguicho; copo de vidro.

**Procedimento** (Van Bezooijen, 2006; EPPO, 2013b):

1. Secar a amostra com um peso máximo de 300 g. Marks & Brodie (1998) defendem que 8 horas à temperatura ambiente é suficiente para a secagem da amostra;
2. Lavar o levigador de Fenwick com água corrente, fechar a saída e encher o Levigador até transbordar com água;
3. Colocar um crivo de 250 µm na saída de transbordo do colar. O crivo deve estar ligeiramente inclinado, para facilitar que a água atravesse pelo crivo;
4. Lavar a amostra de solo através do crivo de 350 µm que se encontra no topo do levigador para reter as partículas grosseiras, através de um jato de água durante 5 minutos ou até a água transbordar limpa pelo colar do levigador;
5. Lavar cuidadosamente o funil e o colar com água para garantir que todos os quistos são arrastados para o crivo de 250 µm;
6. Passar a amostra do crivo de 250 µm para um copo de vidro devidamente identificado;
7. Abrir o ponto de drenagem do levigador e lavar com água abundante.

## **Anexo II – Extração de nemátodes através do método de decantação e crivagem de Cobb**

**Materiais:** Recipientes de plástico, cada um com capacidade de cerca de 4 litros; um conjunto de crivos para nemátodes; Copos de vidro.

**Procedimento** (Mota, 1989b; Van Bezooijen, 2006; Coyne *et al.*, 2007; EPPO, 2013b):

1. Colocar a amostra de solo num recipiente de plástico e adicionar 1 litro de água;
2. Misturar a água e o solo até obter uma suspensão homogénea. Deixar a suspensão repousar e decantar o sobrenadante para outro recipiente de plástico;
3. Agitar o sedimento restante novamente com água. Após 15 segundos, decantar o sobrenadante no mesmo recipiente de plástico que foi usado no ponto 2. Repetir uma terceira vez. O sedimento que sobra pode ser eliminado;
4. Passar a suspensão final do recipiente de plástico através de um conjunto de crivos de nemátodes para outro recipiente. Cada crivo utilizado vai reter nemátodes e materiais do solo com tamanhos diferentes (por exemplo: 350 µm para reter materiais grosseiros, 250 µm para reter quistos e 45 µm para reter nemátodes de formas móveis como *Globodera* ou *Meloidogyne*);
5. Recolher o conteúdo de cada crivo para diferentes copos de vidro devidamente identificados;
6. Observar as amostras à lupa binocular;
7. Se necessário, clarificar as amostras com quistos através dos procedimentos já indicados anteriormente e as amostras com formas móveis através do método de flutuação centrífuga.

### **Anexo III - Extração de nemátodes através do método de flutuação centrífuga**

**Materiais:** Centrífuga, tubos da centrífuga, crivo de 45 µm, solução de sacarose (com uma densidade específica superior a 1,084; por exemplo se se adicionar 454 g de sacarose a 1 L de água, obtém-se uma solução com densidade específica de 1,13).

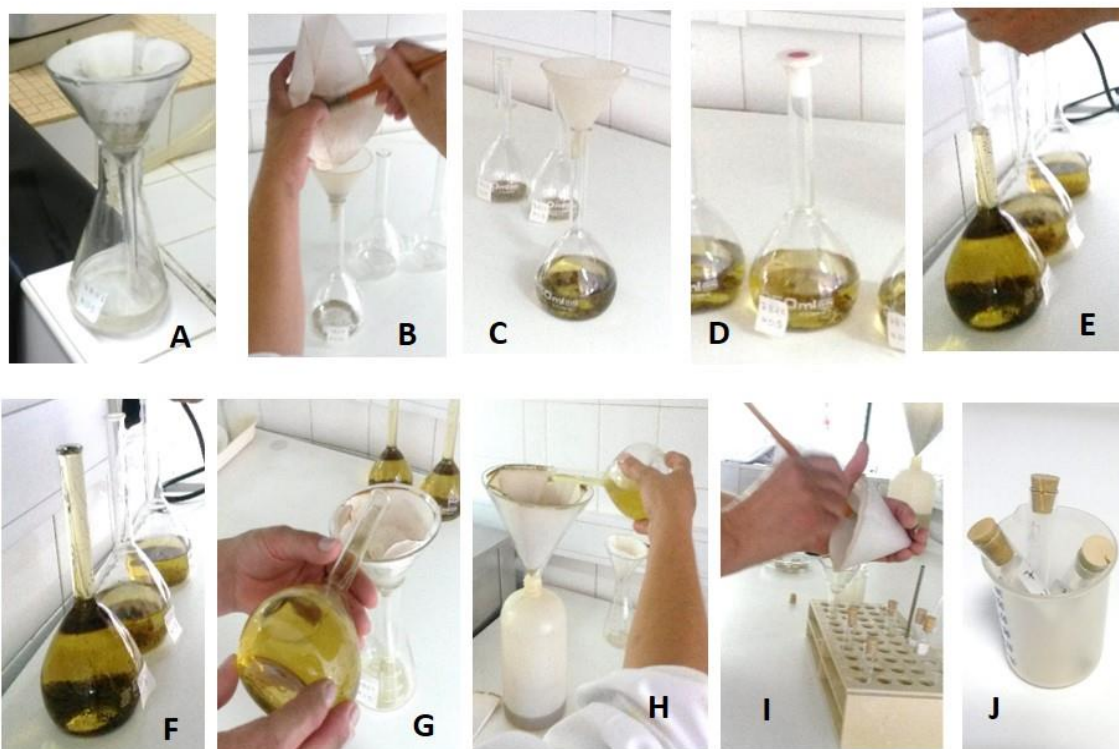
#### **Procedimento (EPPO, 2013b):**

1. Extrair os nemátodes a partir da amostra, seguindo um dos métodos descritos anteriormente;
2. Transferir a suspensão para dois tubos de centrifugação (ou outro número par de) e equalizar o peso dos tubos antes de os colocar na centrífuga. Centrifugar a 420 g (1400 rpm), durante 4 minutos (Mota, 1989b);
3. Deitar fora o sobrenadante. Os nemátodes ficam retidos nos sedimentos que precipitaram;
4. Adicionar a solução de sacarose ao sedimento. Atenção: o elevado valor osmótico do fluido de extração pode provocar plasmólise nos nemátodes, alterando a sua forma ou até mesmo matá-los (dependendo da espécie). Por isso, é essencial limitar o tempo que os nemátodes estão em contacto com o fluido;
5. Equalizar os tubos de centrifugação com a solução de sacarose e centrifugar a 420 g (1400 rpm), durante 30-60 segundos (Mota, 1989b);
6. Retirar o sobrenadante para o crivo de 45 µm. Cuidadosamente lavar com água e recolher os nemátodes num copo de vidro.

## Anexo IV - Isolamento de quistos através de solventes orgânicos

### Procedimento (Van Bezooijen, 2006):

1. Secar a amostra com quistos que foi recolhida através dos métodos de extração de quistos, num papel de filtro (Figuras 46A).
2. Após secar, passar todo o conteúdo seco para um balão de vidro (Figura 46B), adicionar o solvente orgânico (Figura 46C e 46D) e agitar.
3. Adicionar solvente até à boca do balão (Figura 46E) e deixar a suspensão repousar.
4. Após a separação dos materiais orgânicos que sedimentam e dos quistos que flutuam (Figura 46F), decantar cuidadosamente os quistos para um funil forrado com papel de filtro (Figura 46G).
5. Recuperar toda a acetona utilizada neste procedimento para um recipiente, fazendo-a passar por um funil forrado com papel de filtro (Figura 46H).
6. Deixar secar a amostra e passar os quistos para um tubo de vidro (Figuras 46I e 46J), para posteriormente observar à lupa binocular.



**Figura 46** – Método isolamento de quistos com solventes orgânicos